

München, 1960.

**Zur Technik der
Properdinbestimmung**

Felix Schreiber



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555225_0097

AUS DER DERMATOLOGISCHEN KLINIK UND POLIKLINIK
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. A. Marchionini

Zur Technik der
Properdinbestimmung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Felix Schreiber
aus Nürnberg

München 1960

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Priv. Doz. Dr. K. MEINICKE
Correferent: Prof. Dr. A. MARCHIONINI
Dekan: Prof. Dr. H. SCHWIEGK

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juli 1960



*Wer nicht mehr zweifeln kann,
ist der Stagnation verfallen*

A. Schnüpsach

MEINEM VATER

IN DANKBARKEIT GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ZUR GESCHICHTE DES PROPERDINS	7
EIGENSCHAFTEN DES PROPERDINS	9
1. Physikalisch-chemische Eigenschaften	10
2. Serologisch-biologische Eigenschaften	13
III. PROPERDINGEHALT MENSCHLICHER SEREN	13
1. Beim gesunden Menschen	15
2. Properdinwerte bei verschiedenen Erkrankungen	17
V. METHODEN DER PROPERDINBESTIMMUNG	18
1. Properdinbestimmung mittels Zymosan	18
a) Methode nach PILLEMER	21
b) Modifikation nach LEON	22
c) Modifikation nach ISLIKER	23
d) Modifikation nach ZANUSSI	25
e) Modifikation nach DRESSLER	25
f) Modifikation nach SOULIER	25
g) Modifikation nach WILLERS	25
2. Bestimmung von Properdin mit Inulin	28
3. Andere Methoden der Messung von Properdin	28
EIGENE VERSUCHE	29
1. Abnahme des Patientenblutes	30
2. Verwendete Geräte	30
3. Reagenzien	30
4. Vorversuche	31
a) Herstellung des haemolytischen Systems	32
b) Bestimmung der Extinktion	32
c) Eignungsprüfung des RP Serums	33
d) Vorbereitung der Reagenzien	34
e) Durchführung der Methode	34
5. Properdinbestimmung in Patientenserum	39
a) Vorbereitung der Reagenzien	39
b) Ausführung der Methode	40
c) Berechnung der Properdineinheiten	46
6. Ergebnisse	50

VI. DISKUSSION	53
VII. ZUSAMMENFASSUNG	60
VIII. LITERATURNACHWEIS	61

I. ZUR GESCHICHTE DES PROPERDINS.

Seit der grundlegenden Entdeckung der Bedeutung und der Funktion des Komplements in den spezifischen und unspezifischen Abwehrreaktionen des Organismus durch PAUL EHRLICH (1) im Jahre 1899, hat die Erforschung des Phänomens der humoralen Abwehr einen mächtigen Aufschwung genommen.

Bis heute gelingt es mit Sicherheit, vier Komplementfaktoren aus dem Serum zu isolieren, die mit den Symbolen C'_1 - C'_4 bezeichnet werden. FERRATA und SACHS (2) gelang es als ersten 1907, das Komplement in zwei Bestandteile zu zerlegen, die als Mittel- und Endstück bezeichnet wurden. Diese Komplementkomponenten enthalten C'_1 und C'_2 , jedoch daneben noch andere Komplementbestandteile. RITZ (3) gelang dann 1912 der Nachweis einer dritten Komplementkomponente. Die vierte Komplementkomponente wurde 1926 von GORDON, WHITEHEAD und WORMALL (4) gefunden. Sie konnten zeigen, dass C'_4 durch NH_3 inaktiviert wurde. Der wohl erste Versuch einer quantitativen Trennung der vier Komplementbestandteile stammt aus dem Jahre 1938 von HEGEDÜS und GREINER (5). Die vier Faktoren wurden von den Untersuchern entsprechend ihrem Vorgehen als der an Rinderalbumin gebundene Bestandteil (Endstück), als der an den Globulinniederschlag gebundene Bestandteil (Mittelstück), als der durch Hefe getrennte und der durch NH_4OH inaktivierte Bestandteil bezeichnet. KABAT und MAYER (6) haben in neuerer Zeit eine verbesserte Methode der quantitativen Bestimmung der Komplementfaktoren angegeben, die es gestattet, mittels sog. R-Seren (das sind Seren, denen jeweils eine Komplementkomponente entzogen = removed ist) die einzelnen Komponenten zu erfassen.

Einen weiteren Fortschritt brachte dann die Entdeckung eines neuen Proteins im Normalserum durch PILLEMER (7) im Jahre 1954.

Dieser neue Stoff wurde von seinem Entdecker PROPERDIN genannt, abgeleitet von properdere = um zu zerstören, da es sich gezeigt hatte, dass der Zusatz von Properdin (Properdin = P) die normale keimtötende Kraft eines Serums steigern konnte und seine Entfernung zu einem Verlust der Bakterizidie des Serums führte (8).

PILLEMER entdeckte das Properdin, als er präparativ an der dritten Komponente des Komplements arbeitete. Er stützte sich dabei auf die von COCA (9) schon 1914 gemachte Beobachtung, nämlich dass bei der Inaktivierung von Komplement durch Hefe die dritte Komplementkomponente beteiligt ist, die mit Hefezellen eine Verbindung eingeht. Zusammen mit ECKER hatte PILLEMER (55) schon 1941 nachweisen können, dass diese Verbindung eine chemische Bindung der dritten Komponente mit dem wasserunlöslichen Polysaccharid Zymosan (Zymosan = Z) aus der Hefezellmembran darstellt.

Diese Möglichkeit, durch ein unlösliches Polysaccharid selektiv C'_3 zu inaktivieren, wurde von PILLEMER eingehend untersucht. Interessant war zunächst die Beobachtung PILLEMERS, dass Zymosan bei $37^{\circ}C$ aber nicht bei $15^{\circ}C$, das C'_3 inaktivierte. Wurde frisches Serum bei $15^{\circ}C$ mit Zymosan inkubiert, wobei C'_3 erhalten blieb, und dann nach Abzentrifugieren des Zymosans das Serum auf $37^{\circ}C$ gebracht, konnte ein erneuter Zusatz von Zymosan das im Serum verbliebene C'_3 nicht mehr inaktivieren. Das Zymosan hatte also bei $15^{\circ}C$ aus dem Serum einen von PILLEMER zunächst als neuen Faktor bezeichneten Körper entfernt, der zur Inaktivierung von C'_3 durch Zymosan bei $37^{\circ}C$ nötig war. Der Faktor musste sich in dem bei $15^{\circ}C$ abzentrifugierten Bodensatz, an Zymosan gebunden, befinden.

Tatsächlich konnte der an Zymosan gebundene neue Faktor nach Zusatz des auf $37^{\circ}C$ erwärmten Überstandes C'_3 inaktivieren. Dieser neue Faktor war das Properdin. Wenn der Properdin-Zymosan-Komplex (PZ Komplex) bei $37^{\circ}C$ und Ionenstärke 0,6 bei leicht alkalischer Reaktion zur Dissoziation gebracht wurde, enthielt der bei $37^{\circ}C$ von Zymosan getrennte Überstand das Properdin, das zusammen mit Zymosan wieder C'_3 inaktivieren konnte.

Properdin war also in normalem Komplement (C')-haltigen Serum vorhanden. Der Zusatz von Zymosan ergab einen PZ Komplex, der als solcher zur Inaktivierung von C'_3 führte. Die Properdin-Zymosan-Bindung ist auch bei $15^{\circ}C$ möglich, die Inaktivierung von C'_3 jedoch erfolgt erst oberhalb von $17^{\circ}C$, z.B. bei $37^{\circ}C$. Behandelt man ein Serum unterhalb von $17^{\circ}C$ mit Zymosan und befreit dasselbe nach 75 Minuten durch Abzentrifugieren vom PZ-Komplex, so erhält man ein properdinfreies Serum, das als RP Serum (RP = removed Properdin) bezeichnet wird. Dieses RP Serum wird für die Bestimmung des Properdins in anderen Seren verwendet. Es enthält noch alle übrigen Komplementkomponenten, unterscheidet sich aber vom normalen Serum durch das Fehlen der dem Properdin zukommenden Eigenschaften, die es aber nach Properdinzusatz wieder gewinnt.

II. EIGENSCHAFTEN DES PROPERDINS.

1) PHYSIKALISCH-CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN.

PILLEMER und Mitarbeiter haben in ihren Arbeiten (7, 10) genaue Angaben über die Eigenschaften von Properdin und seine Darstellung gegeben. Es gelang den Autoren durch wiederholte Dialyse und Ultrazentrifugierung, das Properdin etwa 3000fach anzureichern. Von anderen Untersuchern wurde eine bis 7000fache Anreicherung erzielt. Eine völlige Reindarstellung von Properdin ist nach LANG (11) wohl noch problematisch.

Das Properdin ist ein Eiweiss und entspricht den Löslichkeitsbedingungen eines Euglobulins. Bei der Dialyse aus einer wässrigen Lösung präzipitiert es bei pH 5,8 und hat ein breites Löslichkeitsminimum zwischen pH 5 - 6. Bei der Fraktionsmethode nach COHN wird es überwiegend in der III. Fraktion zusammen mit Lipoproteinen ausgefällt. Nach PILLEMER gehört das Properdin in die Gruppe der Gamma-Globuline. Im Gegensatz dazu fanden SCHEIFFARTH und Mitarbeiter (12) bei immunoelektrophoretischen Studien (Immunoelektrophorese nach GRABER und WILLIAMS, Agardiffusionstest nach OUCHTERLONY) mit dem Properdin-Zymosan und Properdin-Inulin Komplex, dass sich das Properdin im menschlichen Serum wie ein Beta-Globulin verhält, ein Befund, der in Einklang mit Beobachtungen anderer Autoren steht, denen infolge bei einer Agammaglobulinämie normale Properdinwerte vorliegen können.

ISLIKER und LINDER wiesen mit C¹⁴ markiertem Leucin (das zur Properdinsynthese benötigt wird) beim Kaninchen nach, dass die Halblebenszeit des Properdins wesentlich kürzer (2 - 3 Tage) als diejenige der Gamma- und Beta-Globuline (6 - 8 Tage) ist. Der "turnover" der Beta-Globuline scheint nach ihren Angaben rascher zu erfolgen als der der Gamma-Globuline. Daraus ist zu folgern, dass sich das Properdin eher wie ein Beta-Globulin verhält.

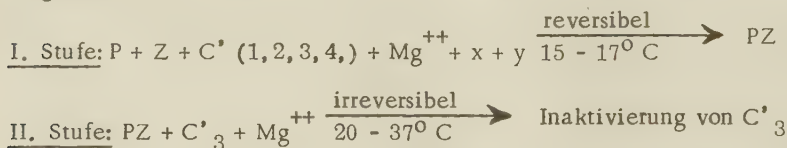
Nach PILLEMER ist das Properdin auf Grund einer Sedimentationskonstanten in der Ultrazentrifuge von 27 S das schwerste Eiweissmolekül im Serum. Das Gamma-Globulin des Menschenserums hat ein Molekulargewicht von 156 000, Menschenfibrinogen etwa 400 000. Das Properdin wurde von PILLEMER (7) auf mindestens das achtfache des Molekulargewichtes von Gamma-Globulin, d. h. ca. 1,2 Millionen geschätzt. Properdin hat ein scharfes Absorptionsmaximum bei 280 m μ . Von ISLIKER (14) wurden bei elektrophoretischen Messungen von etwa 2 500fach angereicherten Properdinpräparaten PILLEMERS Befunde bestätigt. Im Serum ist Properdin stabil bis 48° C und wird bei 50° C unvollständig und bei 56° C innerhalb von 30 Minuten völlig inaktiv. Da Properdin in angereicherter Form nach Versuchen ISLIKERS (14) sogar 66° C für 30 Minuten aushalten kann, ist die ge-

ringe Stabilität im Serummilieu wahrscheinlich durch Komplexbildung mit anderen Serumbestandteilen bedingt.

Gegenüber geringen pH-Änderungen ist Properdin relativ unempfindlich (14). Nach PILLEMER (7) hält sich Properdin für 1 - 2 Tage bei 1° C völlig aktiv und wird durch wiederholtes Einfrieren auf -20° C und Auftauen oder bei längerer Aufbewahrung zwischen 0° C und -20° C nicht zerstört. Properdin kann bei -20° C ohne nennenswerten Wirkungsverlust über längere Zeit gehalten werden. Nach DRESSLER (18) verträgt Properdin Temperaturen bis -75° C.

2) SEROLOGISCHE UND BIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN DES PROPERDINS.

Wie bereits von PILLEMER (7) vermutet worden war, verläuft die Reaktion von Zymosan mit Properdin und Komplement in mindestens zwei Stufen, was LEON (24) in seinen kinetischen Studien klar herausstellte. In der ersten Stufe erfolgt bei 15 - 17° C in Anwesenheit aller Komplementkomponenten und unter Mitwirkung von Magnesiumionen und noch unbekannter Faktoren die Bildung des PZ Komplexes. In der zweiten Stufe inaktiviert der PZ Komplex bei 20 - 37° C in Gegenwart von Magnesiumionen das C' ₃. Formelmässig dargestellt ergibt sich folgendes Bild:



x und y sind noch unbekannte Faktoren nach LEON (23).

Da das Properdin zur Entfaltung seiner biologischen Wirksamkeit aller vier Komplementkomponenten und Mg⁺⁺ in der im Serum vorkommenden Konzentration bedarf, spricht man auch vom Properdin-Komplement-System.

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass ein properdinhaltiges Serum eine gewisse baktericide Potenz besitzt, und es dadurch möglich war, die Bedingungen der Funktion des Properdins zu untersuchen, lag es nahe, das Properdinsystem zu definieren (8). Properdin allein hat keine baktericiden Fähigkeiten, es kann sie nur in Gegenwart der übrigen Komplementkomponenten und einer Mindestkonzentration von Magnesiumionen von 5×10^{-5} mol. entwickeln. Keine Komplementkomponente darf fehlen. Das Vorhandensein noch weiterer Faktoren im System der baktericiden Serulkörper wird diskutiert, ist aber noch nicht endgültig gesichert.

PILLEMER gelang es, Properdin quantitativ zu erfassen und damit Einblick in die komplizierte Funktion der humoralen Abwehr zu gewinnen. Properdin stellt nach PILLEMER (7) nur 0,03 % des Gesamteiweißgehaltes des Menschenserums dar, und da normales menschliches Serum etwa 4 - 8 Einheiten Properdin/ml enthält, entsprechen einer Einheit etwa 3 Milligramm Properdin. Von ISLIKER (40) wurden 2 mg Properdin in 100 ml menschlichen Serums errechnet. Bei der üblichen Inaktivierung eines Serums bei 56° C für 30 Minuten wird auch Properdin inaktiv, es ist aber keine Komponente des haemolytischen Komplementes. Properdin ist auch keine Komponente des Gerinnungssystems (41). Properdin bindet sich ausser an Zymosan noch an zahlreiche Stoffe aus der Polysaccharidreihe (33). Von WEDGWOOD (42) wurde ein Einfluss spezifischer Antikörper auf die Aktivität von Properdin beobachtet. Die Gegenwart spezifischer Antikörper kann die Properdinwirkung hemmen, worin auch eine Schwierigkeit in der Herstellung geeigneter Testreagenzien für die Properdinbestimmung zu sehen ist.

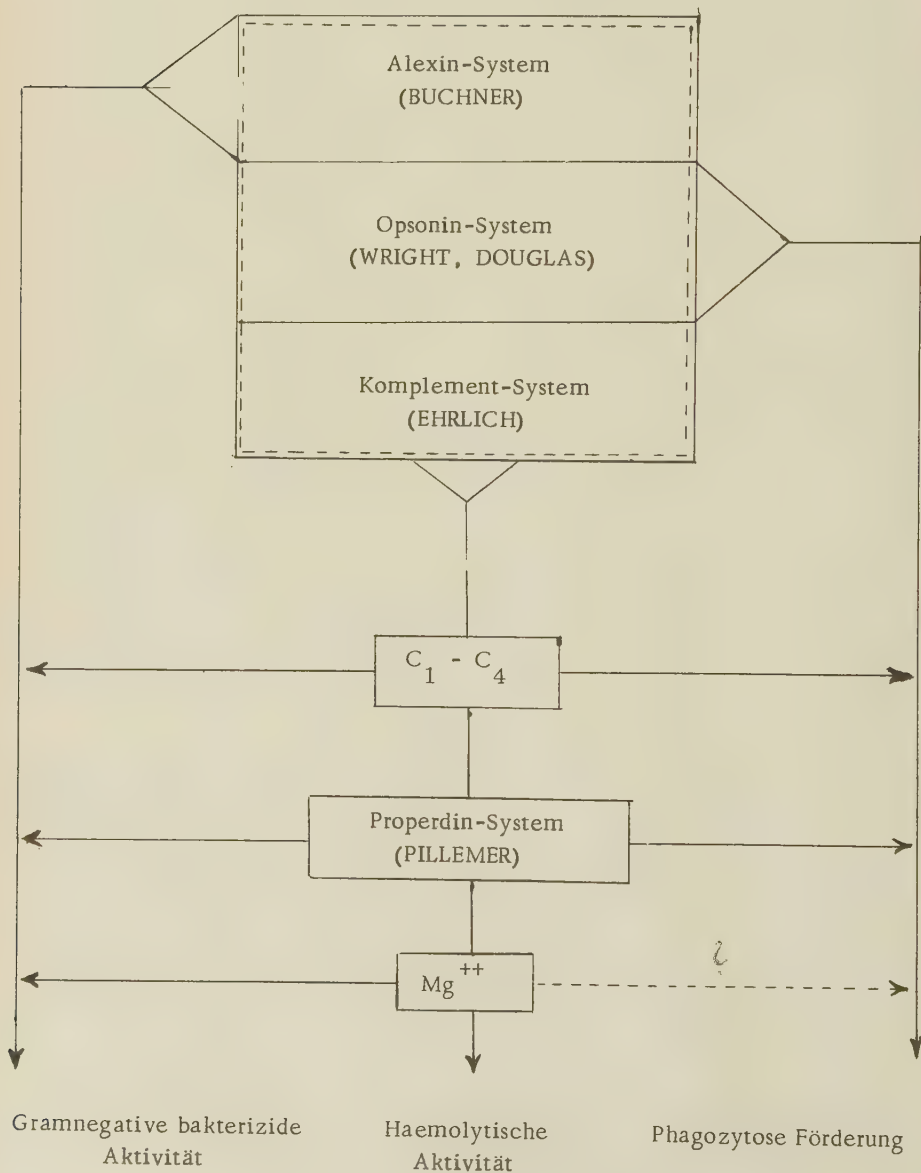
PILLEMER (37) gelang es, von Albinokaninchen, die er mit menschlichem Properdin behandelte, ein Anti-Propredin-Serum zu gewinnen. Sowohl dieses Anti-P-Serum als auch ein inaktiviertes Anti-P-Serum gaben mit frischem menschlichen Serum ein Präzipitat und eine positive Komplementbindungsreaktion. Die Frage, ob das Properdin als ein Antikörper mit besonders weitem Wirkungsspektrum anzusehen sei, ist noch nicht entschieden. PILLEMER lehnte eine Antikörpermatur des Properdins ab. Inwieweit die Ergebnisse BLATTBERGS (43) über die mögliche antigene Wirkung von Zymosan den Rückschluss auf die Antikörpermatur des Properdins zulassen, bedarf noch weiterer Klärung. In neuerer Zeit glaubte R.A. NELSON jr. (44), im Properdinsystem die Wirkung natürlicher Antikörper auf Antigene mittelst Komplement zu sehen, wobei aber H. SCHMIDT anführt, dass es unklar bleibt, welcher Natur die Antigene sein müssen, um die Vielfalt der Wirkungen des Properdins erklären zu können.

Auf die zahlreichen biologischen Funktionen des Properdins im Zusammenhang mit der Blutbakterizidie, auf seine Bedeutung bei Infektionskrankheiten, die Rolle, die es bei der paroxysmalen Hämoglobinurie Marchiafava-Micheli spielt und sein Verhalten nach Strahlenschädigung, im Schock, bei Tumoren usw., kann im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen werden.

Die Stellung des Properdin-Komplement-Systems im Mechanismus der humoralen Abwehr soll folgendes Schema von SKARNES und WATSON (45) veranschaulichen.

Abbildung 1

Die Stellung des Properdin-Komplement-Systems im Mechanismus der humoralen Abwehr nach SKARNES und WATSON.



III. PROPERDINGEHALT MENSCHLICHER SEREN.

1) BEIM GESUNDEN MENSCHEN.

Je nach der Technik der Properdinbestimmung und mit gewissen Schwankungen bei den einzelnen Untersuchern finden sich folgende, jeweils im Bereich der Norm liegende Werte.

Tabelle 1

Properdinwerte menschlicher Normalseren in Abhängigkeit von der angewendeten Methodik und vom Untersucher.

Technik Properdinbestimmung	Untersucher	Properdineinheiten in 1 ml Normalserum
PILLEMER	PILLEMER (7)	4 - 8
PILLEMER	ROTTINO u. a. (16)	2 - 12
ISLIKER	ISLIKER (26)	5 - 12
ISLIKER	PONDMAN (32)	0 - 16
ISLIKER	v. GRAEVENITZ (19)	0 - 20
PONDMAN	PONDMAN u. a. (32)	4 - 16
v. GRAEVENITZ ^x	v. GRAEVENITZ (19)	1 - 12
SOULIER	SOULIER (29)	8 - 16
DRESSLER	DRESSLER (18)	4 - 20
FRITZSCHE, SCHULTZE u. a.	FRITZSCHE u. a. (15)	5 - 10

^x Bestimmung des sog. "available Properdin."

Von KOCH, SCHULTZE und SCHWICK (21) liegen Untersuchungen über den Properdin- und Komplementgehalt im Säuglingsalter vor. Nach diesen Autoren ist der Properdinspiegel im ersten Viertel Lebensjahr deutlich herabgesetzt, erreicht aber für das zweite Halbjahr bereits Werte, wie sie auch bei normalen Erwachsenen beobachtet werden. Die Befunde werden mit der noch nicht voll funktionsfähigen Leber des Säuglings erklärt.

Eine Übertragung des mütterlichen Properdins auf das Kind durch Kolostrum oder Milch scheidet aus, da PILLEMER in beiden Flüssigkeiten kein Properdin nachweisen konnte. Auch der Liquor cerebrospinalis und Ascites sind nach PILLEMER frei von Properdin. Eine diaplazentare Übertragung des Properdins auf das Kind, analog der passiven Übertragung mütterlicher Antikörper, kommt unseres Erachtens wegen der Grösse des Properdinmoleküls ebenfalls nicht in Frage.

FUMAROLA hat ebenfalls den Properdinspiegel bei Neugeborenen und Kleinkindern untersucht (20). Seine Ergebnisse sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 2

Properdingehalt bei Neugeborenen und Kleinkindern nach FUMAROLA (20).

Alter	Anzahl	P-Einheiten/ml	% der Fälle ohne Properdin
Neugeborene	12	5,4	25 %
1 - 12 Monate	18	6,4	27,7 %
12 - 24 Monate	34	5,05	26,7 %
2 - 14 Jahre	54	-	25,9 %
Summe:	118	Durchschnitt: 5,46	26,52 %
Unreife Feten	25	1,8	88 %

DRESSLER (18) hat in ausführlichen Studien über das Verhalten des Properdinspiegels beim gesunden Erwachsenen unabhängig von der Zeit eine bemerkenswerte Konstanz des Properdinspiegels feststellen können. Der Properdinspiegel wurde in stündlichen, täglichen und wöchentlichen Abständen bestimmt. Die gefundenen Werte waren bei verschiedenen Versuchspersonen sehr unterschiedlich (s. Tab. 1, DRESSLER), beim Einzelindividuum dagegen auffallend konstant.

DRESSLER bestätigte auch die unter anderem von FRITZSCHE und SCHULTZE (15) gemachte Beobachtung, dass der C'_3 Titer und der Properdingehalt eines

Serums in keiner Korrelation zueinander stehen, das heisst, hohe Properdinwerte können mit normalen C'_3 Titern und umgekehrt einhergehen. Eine Feststellung, die auch wir machen konnten.

2) PROPERDINWERTE BEI VERSCHIEDENEN ERKRANKUNGEN.

Vor allem durch Tierversuche ist der Abfall des Properdintiters beim hämorrhagischen Schock, beim Peptonschock und nach Röntgenbestrahlung ausreichend gesichert (22).

Über die Höhe des Properdintiters bei verschiedenen Erkrankungen liegen im Schrifttum zahlreiche Einzelbeobachtungen vor, die zum Teil noch der Bestätigung bedürfen. Als orientierender Überblick sei eine Tabelle von SCHULTZE und SCHWICK (22) wiedergegeben.

Tabelle 3

Properdintiter bei verschiedenen Erkrankungen.

Erhöhte Titer wurden gefunden:	Erniedrigte Titer wurden gefunden:
Generalisierte Peritonitis	Bakterielle Infekte (gramneg. Keime)
Bronchopneumonie	Diabetes mit Infekten
Lungenabszess	Wundinfektion nach Verbrennung
Peritonsillarabszess	Paroxysmale Hämoglobinurie Marchiafava
Cholangitische Cirrhose	Ileus, gastrointestinale Blutungen
Cholangitis obliterans	Splenektomie (2 von 5 Fällen)
Mononukleose	Nach Enzephalographie
Osteopathie	Nach Entbindung
Hämolyt. Ikt. b. chron. Hepatitis	Verbrennungen 2. und 3. Grades
	Progressive Tuberkulose
	Schwerer Kreislaufkollaps
	Betatronbestrahlung (Tierversuche)
	Agammaglobulinämie (nicht regelmässig)
	Ewing-Sarkom
	Metastasierende Geschwülste
	Carcinome
	Myxödem
	Chron. Lymph. Leukämie
	Chron. Nephritis
	Chron. Glomerulonephritis (bei Schub)
	Gammaplasmozytom
	Rheumat. Arthritis
	Vitaminmangel (Tierversuche)
	Hautinfektionen u. Gangränöse Krankheitsbilder

Bei einer Beurteilung von Tabelle 3 ist zu bedenken, dass es sich einmal um Mitteilungen zahlreicher Autoren handelt, deren Technik der Properdinbestimmung jeweils verschieden war, zum anderen, dass die Properdinwerte bei den angeführten Krankheitsbildern überwiegend Einzelbeobachtungen waren. Es bleibt also offen, ob die von einem Autor mit seiner Technik bei einem Krankheitsbild ermittelten Properdinwerte mit einer anderen Technik von einem anderen Untersu-

cher bestätigt werden können. Ebenso steht noch nicht fest, ob bei den angegebenen Krankheitsbildern ein einheitliches Verhalten der erhöhten oder verminderten Properdinwerte angenommen werden darf.

Mitteilungen über Properdinbestimmungen bei verschiedenen Dermatosen konnten im deutschen Schrifttum nicht gefunden werden. Im angelsächsischen Schrifttum jedoch wurde kürzlich von McNALL, NEWCOMER, STERNBERG und Mitarbeiter (50, 51) über Properdinbestimmungen bei verschiedenen Dermatosen berichtet. Im folgenden sollen die verschiedenen Methoden der Properdinbestimmung besprochen und unter besonderer Berücksichtigung der Technik eigene Versuche zur Properdinbestimmung bei Hautkrankheiten mitgeteilt werden.

IV. METHODEN DER PROPERDINBESTIMMUNG.

Seit PILLEMER seine Originalmethode der Properdinbestimmung mittels Zymosan vor über 6 Jahren bekannt gegeben hat, sind fast ein Dutzend Modifikationen seiner Technik und mehrere auf anderen Vorstellungen beruhende Messverfahren für Properdin angegeben worden.

Die einzelnen Modifikationen haben sich aus der Beachtung der Fehlerquellen bei Anwendung der Originalmethode und aus dem Fortschreiten der Erkenntnisse der Properdinforschung ergeben. Da innerhalb jeder einzelnen Methode bzw. Modifikation natürliche Fehlerquellen bestehen, und da durch die Modifikationen erneute, bisher nicht vorhandene, theoretische und technische Fehler auftreten können, ist ein Vergleich und eine Beurteilung der Ergebnisse verschiedener Methoden sehr erschwert, bei fehlender genauer Angabe der Technik unmöglich. Aus der Tabelle 1 ist erstens ersichtlich, welch grosse Schwankungen der Properdintiter schon bei Normalseren innerhalb der methodischen Fehlergrenze eines Messverfahrens aufweist und zweitens, welche Unterschiede sich aus einem Vergleich verschiedener Methoden ergeben.

Vor einer Besprechung unserer eigenen Versuche sollen im folgenden zunächst die wichtigsten Verfahren der Properdinbestimmung und ihre Modifikationen geschildert werden, wobei wir aus historischen Gründen mit der Beschreibung der Originalmethode PILLEMERS beginnen wollen.

1) PROPERDINBESTIMMUNGEN MITTELS ZYMOZAN.

a) Methode nach PILLEMER und Mitarbeitern (10).

PILLEMER hat in seinen Arbeiten (7, 10) die Herstellung aller von ihm zur Properdinbestimmung verwendeten Reagenzien und die Definition ihrer Masseinheiten angegeben.

Eine Einheit Properdin ist nach PILLEMERS Definition die Menge, die in Gegenwart von optimalen Mengen Zymosan 120 ± 30 Einheiten C'_3 in einem ml RP Serum während einer Inkubation von 60 Minuten bei 37°C inaktiviert.

Ein zur Properdinbestimmung geeignetes RP Serum soll nach PILLEMER folgende Eigenschaften besitzen:

1. Es muss sämtliche 4 Komplementkomponenten in ausreichender Menge enthalten (C_1 bis C_4).
2. Es darf keine antikomplementären Eigenschaften aufweisen.
3. Der C'_3 Gehalt muss mindestens 100 - 120 Einheiten/ml betragen.
4. Bei der Behandlung mit Zymosan bei 37°C darf der C'_3 Titer um höchstens 20 % vermindert werden.

Von einem zur Properdinbestimmung geeigneten R_3 Serum (R_3 = ein Serum, dem Properdin und die dritte Komplementkomponente C_3 entzogen ist) fordert PILLEMER genügend C_1 , C_2 , C_4 , so dass durch Zusatz eines weiteren R_3 Serums mindestens 50 % der haemolytischen Aktivität des Ausgangsserums wieder hergestellt werden. Ausserdem darf ein R_3 Serum sensibilisierte Schaferythrozyten nicht haemolisieren und nicht antikomplementär wirken.

PILLEMER hatte die von ihm verwendeten RP Seren und R_3 Seren aus menschlichem Serum hergestellt.

Als Indikator der C'_3 Verminderung durch den Properdin-Zymosan-Komplex verwandte PILLEMER ein haemolytisches System von Schafblutkörperchen, die mit 4 Einheiten Ambozeptor/ml sensibilisiert waren. Die Messung der Haemolyse erfolgte in einem Fotometer bei einer Wellenlänge von 550 m μ . Als Pufferlösung diente ein Barbituratpuffer (Michaelispuffer). Das Prinzip der Properdinmessung nach PILLEMER ist die Bestimmung der geringsten Menge von Testserum, die nach einstündiger Inkubation im Wasserbad bei 37°C mit konstanten Mengen Zymosan und RP Serum das gesamte C'_3 der Mischung inaktiviert.

Es werden in jedes Röhrchen einer angesetzten Reihe im Eisbad 0,1 ml Zymosansuspension (entspricht 3 mg Z), 0,25 ml RP Serum und fallende Mengen von Testserum (beginnend von 0,25 ml bis 0,03 ml) gegeben. Durch Hinzufügen von Barbituratpuffer wird das Volumen eines jeden Röhrchens auf 0,75 ml gebracht. Nach gründlichem Schütteln werden die Röhrchen eine Stunde bei 37°C unter 10minu-

tigem Schütteln im Wasserbad inkubiert. Um den gebildeten PZ Komplex zu Boden zu bringen, werden die Röhrchen dann 10 Minuten bei 2000 U/Min. zentrifugiert.

Bis jetzt hat also jedes Röhrchen Zymosan, RP Serum und fallende Mengen von properdinhaltigem Testserum erhalten, so dass sich der PZ Komplex in abnehmenden Mengen bilden konnte. Der PZ Komplex konnte in fallendem Ausmass das im RP Serum zugesetzte C'_3 inaktivieren. Um nun die restlichen C'_3 Mengen zu messen, wird von 0,2 ml des Überstandes in den Röhrchen eine Verdünnungsreihe von 1 : 1 bis 1 : 16 mit Puffer angelegt. In jedes Röhrchen der Verdünnungsreihe werden 0,05 ml (2 Einheiten) R_3 Serum zugegeben und das Volumen eines jeden Röhrchens mit Puffer auf 0,5 ml gebracht und schliesslich 1,0 ml sensibilisierter Schaferythrozyten hinzugefügt. Nach Inkubation der Ansätze im Wasserbad von 37° C während 30 Minuten wird anschliessend 5 Minuten bei 1 500 U/Min. zentrifugiert.

Die Röhrchen werden mit einer 50 %-Haemolyse-Standardlösung verglichen und das Röhrchen bestimmt, dessen Verdünnung der 50 %-Haemolyse entspricht. Die C'_3 Einheiten in den Überständen werden auf ein Milliliter RP Serum umgerechnet. Hat sich z.B. bei einer Verdünnung von 1 : 12 eine 50 %-Haemolyse ergeben, so enthält dieses Röhrchen $12 \times 1/0,2 = 60 \text{ E } C'_3$. Da aber die C'_3 Einheiten auf unverdünntes RP Serum berechnet werden und das RP Serum während der Arbeitsgänge verdünnt wurde, enthält unser Röhrchen $60 \times 3 = 180 \text{ E } C'_3$, bezogen auf unverdünntes Testserum. Lässt sich in keinem Röhrchen eine Haemolyse nachweisen, so wird angenommen, dass sämtliches C'_3 des RP Serums inaktiviert wurde.

Für die Berechnung der Properdineinheiten wurde von PILLEMER nun das Röhrchen bestimmt, in dem keine Haemolyse mehr nachweisbar war. Die Properdineinheiten werden dadurch bestimmt, dass die Zahl 0,25 (Ausgangsmenge) durch die Testserummenge in dem betreffenden Röhrchen dividiert wird. War z.B. der Endpunkt der Haemolyse mit 0,06 ml Testserum erreicht, so enthielt dieses Serum $0,25 : 0,06 = 4$ Einheiten Properdin/ml. Aus dem Beispiel ist auch ersichtlich, dass mit dieser Methode nicht weniger als eine Einheit Properdin bestimmt werden kann.

Von PILLEMER wurden auch Kontrollen der verwendeten Reagenzien bei den Versuchen mitgeführt. Der C'_3 Titer des verwendeten RP Serums wurde vor und nach Zymosanbehandlung bestimmt und durfte keine Änderung durch die Zymosanbehandlung aufweisen. Ausserdem wurde das verwendete RP Serum mit einer Einheit eines Properdinpräparates unter Zusatz von Zymosan versetzt und anschliessend der C'_3 Gehalt bestimmt, der dabei 0 Einheiten ergeben musste (entsprechend der Definition: 1 E Properdin inaktiviert $120 \pm 30 \text{ E } C'_3$). Dadurch wurde auch kontrolliert, ob genügend $C_1 - C_4$ vorhanden war und ob der PZ Komplex auf C'_3 einwirkte.

Mit der geschilderten Methodik bestimmte PILLEMER den Properdingehalt menschlichen Normalserums mit 4 - 8 Einheiten/ml. Bei gleicher Versuchsanordnung aber unter Verwendung artspezifischer Testreagenzien wurden von PILLEMER und Mitarbeitern (10) die Properdintiter verschiedener Tierseren bestimmt. Mit 25 - 30 Einheiten wies Rattenserum den höchsten Properdintiter auf, während Meeresschweinchenserum mit 1 - 2 Einheiten den niedrigsten Titer hatte.

Findet man mit PILLEMERS Methode bei menschlichen oder tierischen Normalseren Werte, die signifikant höher sind als die von ihm angegebenen, so kann das nach PILLEMER auf folgenden Fehlerquellen beruhen:

a) Haemolyseresistenz der verwendeten Erythrozyten. Die Lyse des Systems sensibilisierter Erythrozyten $/R_3$ durch C'_3 kann durch verschiedene Serumbestandteile gehemmt werden. Unter anderem wurden dafür peptidartige Substanzen, die durch Proteolyse von Zellwandeisweiss entstehen sollen, verantwortlich gemacht (53).

b) Fehlen einer Komplementkomponente im R_3 Serum. Das bedeutet, dass die C_3 Inaktivierung zu spät oder gar nicht einsetzt, wenn die übrigen Komponenten im RP Serum und evtl. auch im Testserum in ungenügendem Ausmass oder gar nicht vorhanden sind.

c) Ungewöhnliche Empfindlichkeit des verwendeten RP Serums auf Properdin und

d) Antikomplementäre Eigenschaften eines der verwendeten Seren.

Bei signifikant niederen Properdinwerten gibt PILLEMER die folgenden Fehlermöglichkeiten an:

a) Fragilität der verwendeten Erythrozyten.

b) Das verwendete R_3 Serum war lytisch gegen die Erythrozyten.

c) Es fehlen Faktoren im RP Serum, die für die PZ Bildung erforderlich sind. Wir möchten annehmen, dass damit mögliche Cofaktoren gemeint sind, deren Natur noch unbekannt ist.

d) Artunverträglichkeit zwischen RP Serum und Prüfserum. Gemeint sind damit wohl komplementhemmende Faktoren, durch die eine Haemolyse verhindert wird.

Die von PILLEMER vorgeschlagene Methode der Properdinbestimmung hat nun in den letzten Jahren von verschiedener Seite berechnigte Kritik erfahren und zu zahlreichen Modifikationen geführt. Auffallend ist bei PILLEMERS Methode zunächst die Tatsache, dass der Zuwachs an C'_3 durch das zu untersuchende Testserum nicht mit berücksichtigt wird. Das erscheint bereits insofern eigenartig, weil PILLEMER in einem als Beispiel von ihm angeführten typischen Messprotokoll

den C'_3 Titer des Testserums und den C'_3 Titer von Testserum und RP Serum zusammen bestimmte, die gefundenen unterschiedlichen Werte aber in keiner Weise bei der Berechnung der Properdineinheiten berücksichtigt hat. Bei hohem C'_3 Gehalt und niederem Properdingehalt im Testserum würde der C'_3 Titer des Serums-gemisches (RP Serum u. Testserum) im Zymosanansatz kaum erniedrigt werden und die Properdineinheiten sich somit der Messung entziehen. Bei einem Testserum mit hohem C'_3 Gehalt und hohen Properdinwerten würden mit dem PILLEMER'schen Verfahren ebenfalls zu niedere Properdinwerte gemessen. Eine weitere Fehlermöglichkeit bildet auch die Bestimmung des Haemolyseendpunktes, da die völlige Lyse oder Nichtlyse eines haemolytischen Systems schwieriger einzustellen ist als eine 50 %-Haemolyse.

FRITZSCHE und SCHULTZE (15) haben auf Grund dieser Überlegungen eine Modifikation der PILLEMER'schen Methode entwickelt, die die angeführten Fehlermöglichkeiten ausschaltet. Da wir diese Modifikation selbst verwendet haben, wird sie später ausführlich beschrieben.

LEON (23) machte in seinen kinetischen Studien über die Reaktionsweise des Properdin-Komplement-Systems zunächst darauf aufmerksam, dass bei einem Ansatz von Testserum, Zymosan und RP Serum bei 37°C in beiden Stufen der Reaktion (siehe Seite 10) Komplikationen durch unbekannte Komplementkomponenten des Testserums und des RP Serums möglich sind. Die Reaktion kann bereits durch unverdünntes Testserum gestört werden, da dessen C'_3 Gehalt mit dem im zugesetzten RP Serum befindlichen C'_3 in noch unbekannter Weise interferieren kann. LEON (24) zeigt weiter, dass bei konstanter Temperatur und bei konstantem Zymosangehalt die Testserumverdünnung einen starken Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit hatte. Bei 1 : 2 und 1 : 4 verdünntem Testserum war die Reaktionsgeschwindigkeit grösser als bei unverdünntem Serum. Bei einer Verdünnung von 1 : 8 und 1 : 16 ging die Inaktivierung von C'_3 erst langsam aber nach 10 - 15 Minuten mit steigender Geschwindigkeit vor sich. Bezüglich der Abhängigkeit der Reaktion von der Zymosankonzentration wies LEON (24) nach, dass Zymosan im Überschuss vorhanden sein muss, um eine Reaktion erster Ordnung zu gewährleisten. Eine Induktionsperiode trat erst auf, wenn die Konzentration von Zymosan 2 mg/ml erreicht hatte.

Um nun die Interferenz unbekannter Faktoren im Testserum auszuschalten, entwickelte LEON (25) eine Modifikation der PILLEMER'schen Methode, die er auf dem VI. internationalen Kongress für Haematologie 1957 in Kopenhagen vortrug.

b) Modifikation nach LEON (25)

Das Wesentliche dieser Modifikation besteht darin, dass das Prüfserum mit RP Serum und Zymosan im Überschuss für 75 Minuten bei 15°C gehalten wird, um die Bil-

dung des PZ Komplexes zu ermöglichen. Eine Inaktivierung von C'_3 findet bei diesem Schritt noch nicht statt. Dann wird in der Kälte zentrifugiert, der PZ Komplex einmal in vorgekühlter Pufferlösung gewaschen und in Pufferlösung resuspendiert. Jetzt wird der PZ Komplex einer bestimmten Menge frischen RP Serums zur erneuten Inkubation nun bei 37°C für 30 Minuten zugesetzt. Die Messung von C'_3 erfolgt mit einem haemolytischen System sensibilisierter Schaferythrozyten, das genügend von den übrigen Komplementkomponenten mit Ausnahme von C'_3 besitzt (Verwendung eines R_3 Serums vom Meerschweinchen). Da der gemessene C'_3 Titer der benutzten PZ Menge direkt proportional ist, ermöglicht ein Vergleich mit einem Standard-Propardin-haltigen Serum den Properdin Gehalt zu messen.

Gleichzeitig machte LEON den Vorschlag, das sogenannte "available Properdin" (d.h. verfügbares Properdin) zu bestimmen. Das available Properdin ist die Menge Properdin, die man in einem Serum mit einer haemolytischen Methode ohne Zusatz von Komplementfaktoren ermitteln kann. Das mit dieser Methode erfassbare Properdin soll den Verhältnissen in vivo näher kommen, da bei der Bestimmung des available Properdins ein Zusatz von Komplementkomponenten unterbleibt.

Man inkubiert das Testserum nur mit Zymosan zunächst bei 17°C für 75 Minuten. Dem abzentrifugierten PZ Komplex wird dann ein RP Serum und R_3 Serum zur Inkubation bei 37°C zugesetzt. Der Schwund des RP Serums an aktivem C'_3 wird mit Hilfe eines haemolytischen Systems festgestellt. Dieses Vorgehen ist ähnlich dem ersten Vorschlag LEONS, nur dass bei der Inkubation des Testserums mit Zymosan der Zusatz eines RP Serums unterbleibt.

c) Modifikation nach ISLIKER (26).

ISLIKER hat ebenso wie PILLEMER sämtliche zur Properdinbestimmung benötigten Reagenzien selbst hergestellt und sich dabei weitgehend an die Angaben PILLEMERS gehalten. Im Prinzip entspricht die Modifikation ISLIKERS der PILLEMERSchen Originalmethode, weicht aber in einigen Punkten von ihr ab. Im einzelnen ging ISLIKER wie folgt vor.

Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe des Testserums von 1 : 1 bis 1 : 32 mit Michaelispuffer hergestellt. Nun wurden zu 0,1 ml eines jeden Röhrchens dieser Verdünnungsreihe 0,2 ml einer RP Serum-Zymosan-Mischung (1 mg Zymosan u. 0,1 ml RP Serum enthaltend) zugegeben und die Röhrchen unter ständigem Schütteln eine Stunde bei 37°C inkubiert. Da die Unterlassung der Entfernung des PZ Komplexes keinen Einfluss auf die Properdineinheiten hatte, wurde ohne vorheriges Abzentrifugieren des PZ Komplexes jedem Röhrchen 2,0 ml einer 0,4 %igen Aufschwemmung sensibilisierter Schafblutkörperchen zugefügt und die Röhrchen

erneut für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Abzentrifugieren des Zymosans und der nicht gelösten Erythrozyten wurden die Haemolysegrade photometrisch bestimmt. Kontrollen der Reagenzien untereinander wurden in jedem Versuch durchgeführt.

Da bei Normalseren im allgemeinen die ersten 3 Röhrchen (Serumverdünnung 1 : 1 bis 1 : 4) keine Haemolyse zeigten, wurden die Haemolysegrade in den folgenden Röhrchen bestimmt. Die reziproken Testserumverdünnungen, die eine 50 %-Haemolyse ergaben, wurden als Properdineinheiten in 1 ml des ursprünglichen Testserums bestimmt, wobei die Properdineinheiten graphisch ermittelt wurden. Die Haemolysegrade eines Röhrchens über der 50 %-Haemolyse und eines Röhrchens unterhalb der 50 %-Haemolyse ergaben als Ordinaten gegen eine logarithmische Skala der reziproken Testserumverdünnungen eine Gerade. Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der 50 %-Haemolyse auf die Abszisse projiziert, ergab die Properdineinheiten in 1 ml Testserum. War z. B. in dem Röhrchen mit einer Testserumverdünnung von 1 : 8 eine 50 %-Haemolyse nachzuweisen, so enthielt das Testserum 8 Einheiten Properdin/ml.

Mit diesem Vorgehen erzielte ISLIKER bei Properdintitern von 0 - 6 Einheiten eine gute Übereinstimmung mit dem PILLEMER'schen Verfahren. Diese Übereinstimmung bestand nicht bei hohen Properdintitern. ISLIKER war sich bewusst, dass er das mit dem Testserum eingeführte C'_3 bei der Properdinbestimmung ausser acht liess, glaubte aber auf Grund der hohen Testserumverdünnungen bei gleichem RP Serumgehalt in jedem Röhrchen die C'_3 Einheiten des Testserums vernachlässigen zu können. Bei hohen Properdintitern spielt das nach ISLIKER keine Rolle, während bei erniedrigten Properdinwerten im Testserum die mit seiner Modifikation gemessenen Properdintiter zu hoch sind. ISLIKER fand in Normalseren 5 - 12 Einheiten Properdin. Seine Modifikation ist eine Vereinfachung des PILLEMER'schen Verfahrens, wobei allerdings die Properdineinheiten durch Bestimmung der 50 %-Haemolyse (und nicht des Haemolyseendpunktes wie bei PILLEMER) ermittelt wurden. Der Zusatz eines R_3 Serums unterbleibt! Die bei der Besprechung der PILLEMER'schen Methode angeführten Bedenken (Einwände LEONS; Nichtberücksichtigung des C'_3 Zuwachses durch das Testserum) gelten aber auch für die Modifikation ISLIKERS.

d) Modifikation nach ZANUSSI, ORTOLANI und Mitarbeitern(27).

In ausgedehnten Versuchsreihen haben ZANUSSI und Mitarbeiter auf mehrere Fehlerquellen in der klassischen Properdintitration nach PILLEMER hingewiesen und daraufhin eine eigene Modifikation vorgeschlagen.

Von den Autoren konnte gezeigt werden, dass Bestimmungen des Properdingehaltes in einem Serum sehr unterschiedliche Werte ergeben können, wenn man bei

sonst unveränderter Versuchsanordnung verschiedene RP Seren verwendet, selbst wenn die RP Seren den Anforderungen PILLEMERS genügen. Weiter wies ZANUSSI nach, dass die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inaktivierung von C'_3 trotz gleicher Versuchsanordnung häufig unterschiedlich ist. Ausserdem fanden die Autoren, dass unverdünntes oder 1 : 2 verdünntes Testserum bei Properdinbestimmungen von normalen oder pathologischen Seren eine Zunahme oder Abnahme des Properdintiters bewirken kann.

Diese Befunde werden von den Autoren mit einer in noch unbekannter Weise erfolgenden Summation der Komplemente des RP Serums und des Testserums erklärt. Durch diese Summation soll die Inaktivierung des C'_3 im RP Serum durch den PZ Komplex gestört werden, worauf auch LEON (24) aufmerksam gemacht hatte. Da bei einer Verdünnung des Testserums von 1 : 10 diese störenden Faktoren weitgehend ausgeschaltet werden, wurde von ZANUSSI folgende Methode der Properdinbestimmung vorgeschlagen.

Das Properdin wird aus der Differenz der C'_3 Titer bei einem Ansatz ohne Zymosan und einem Ansatz mit Zymosan bestimmt. Hierbei werden im Ansatz A 0,25 ml einer 10 %igen Testserumverdünnung mit 0,25 ml RP Serum und 0,25 ml gepufferter phys. NaCl-Lösung versetzt. Der Ansatz B erfolgt in gleicher Weise, nur wird statt Pufferlösung eine 16 mg/ml enthaltende Zymosansuspension in Pufferlösung dazugegeben. Beide Ansätze werden dann für 90 Minuten im Wasserbad von 37°C inkubiert. Nun werden zu jedem Röhrchen 0,25 ml eines R_3 Serums zugegeben und erneut bei 37°C inkubiert, diesmal für 30 Minuten. Nach Abzentrifugieren des PZ Komplexes im Ansatz B wird von beiden Ansätzen eine Verdünnungsreihe angelegt. Nach Zugabe von je 1,0 ml sensibilisierter Hammelerythrozyten zu den Röhrchen der Verdünnungsreihe wird für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Haemolysegrade werden dann photometrisch bestimmt.

Das Mass für die Properdinaktivität in 0,025 ml Prüferserum sind $(A - B) C'_3$ Einheiten. Da eine Einheit Properdin entsprechend der PILLEMER'schen Definition 120 $E C'_3$ inaktiviert, ist eine Einheit Properdin nach der vorgeschlagenen Methode $(A - B) \text{ mal } 40/120 = A - B/3$.

Die wichtigsten Punkte dieser Modifikation sind also neben dem Ansatz mit und ohne Zymosan (wodurch der C'_3 Zuwachs durch das Testserum berücksichtigt wird) die 10 %ige Verdünnung des Testserums, die verlängerte Inkubation mit RP Serum und Zymosan und die Zugabe von R_3 Serum vor dem Abzentrifugieren des PZ Komplexes mit nochmaliger Inkubation. Weiterhin wird berücksichtigt, dass verschiedene RP Seren mit dem gleichen Testserum verschiedene Properdinwerte ergeben können.

e) Modifikation nach DRESSLER (28).

Die von DRESSLER angegebene Modifikation der PILLEMER'schen Originalmethode ist der später zu besprechenden Modifikation von FRITZSCHE und SCHULTZE (15) so ähnlich, dass sich eine eingehende Erörterung an dieser Stelle erübrigt. Ein Unterschied besteht allerdings darin, dass von DRESSLER der bei einer RP Serum-Eignungsprüfung (die den Properdinbestimmungen vorausgeht) mit und ohne Zymosan auftretende Differenzbetrag an C'_3 Einheiten berücksichtigt wird. Das heisst, dass dieser Differenzbetrag, wenn er mehr als 25 % beträgt, in Rechnung gesetzt wird und bei der Berechnung der Properdineinheiten als Nullaktivität des RP Serums mit berücksichtigt wird.

DRESSLER hat auch Methoden angegeben, mittels arteigener Standardseren die Schwierigkeiten zu umgehen, die sich bei Properdinbestimmungen in Tierseren durch die Unverträglichkeit der in die Reaktion eingebrachten Seren ergeben.

f) Modifikation nach SOULIER (29, 30, 31).

SOULIER arbeitete zunächst mit der PILLEMER'schen Originalmethode und mit der Modifikation ISLIKERS. Dabei fand er immer wieder Seren, bei denen er mit beiden Methoden sehr niedrige oder überhaupt keine messbaren Properdinwerte erhielt. SOULIER glaubte die niedrigen Properdintiter entweder auf das Fehlen von Cofaktoren, die zur Inaktivierung von C'_3 nötig sind, oder auf einen Inhibitor der C'_3 Inaktivierung zurückführen zu müssen. Er schlug deshalb vor, bei verdächtigen Seren ein gereinigtes Properdinpräparat (etwa 8 - 16 Einheiten) zuzusetzen und dann C'_3 zu titrieren. Lässt sich nun das zugesetzte Properdin durch den zu erwartenden C'_3 Titerabfall nachweisen, so ist der ohne Zusatz eines Properdinpräparates gefundene Properdinwert echt. Ist der berechnete Properdintiter niedriger als der Standardtiter, so muss eine Inhibierung der C'_3 Inaktivierung stattgefunden haben.

Mit dieser Methodik gelingt es also, eine Hemmung der C'_3 Inaktivierung zu erfassen, wenn sie vollständig ist; eine nur partielle Hemmung ist nicht mit Sicherheit zu erfassen. SOULIER erwähnt in seinen Arbeiten (29) niedere Properdintiter bei gleichzeitiger ausgeprägter Erhöhung der Alpha-2-Globuline im Serum. Eine Bestätigung dieser Ansicht im Sinne einer Inhibierung könnten Befunde von BARANDUM und ISLIKER (38) sein. Diese Autoren fanden deutlich erniedrigte Properdinwerte bei gleichzeitig stark erhöhten Alpha-2-Globulinwerten.

g) Modifikation nach WILLERS, PONDMAN und WINKLER (32).

Properdin wurde von den Autoren zunächst mit der von LEON angegebenen Modifikation der Bestimmung des Gesamtproperdins gemessen. Da hierbei häufig niedrige Properdinwerte gefunden wurden, dachte man auf Grund der Beobachtungen

SOULIERS und ISLIKERS an eine Inhibierung. Im folgenden wurde geprüft, ob sich im Experiment durch Alpha-2-Globuline eine Hemmung der Properdinaktivität nachweisen lässt.

Mittels der Fraktionsmethode nach SCHULTZE (39) (Fällung durch Ammoniumsulfat verschiedener Konzentrationen) gewannen die Autoren aus menschlichem Serum ein gereinigtes und angereichertes Alpha-2-Globulin, das in ihrer Fraktion N gefunden wurde. Diese Fraktion N wurde zu gleichen Teilen mit Humanserum von normalem Properdingehalt zusammengebracht. Wurde nun mit diesem Gemisch eine Properdinbestimmung durchgeführt, so war kein messbares Properdin nachzuweisen. Betrug der Anteil der Fraktion N im Gemisch weniger als die gleiche Volummenge Testserum, so war die Verminderung des Properdintiters fraglich. Bei hohen Ausgangstitern vermochte erst die zweifache Volummenge der Fraktion N den Properdintiter ganz eindeutig zu senken. Es erscheint uns allerdings fraglich, ob in Seren mit hohen Properdintitern (über 16 E/ml) derartige Konzentrationen eines Inhibitors aus der Gruppe der Alpha-2-Globuline in vivo vorkommen.

Durch Zerlegen der Properdinbestimmung in 2 Stufen analog dem Vorgehen LEONS (PZ Bildung in der Kälte und anschließende Überführung in frisches RP Serum) und durch Zugabe der Fraktion N zu je einer Stufe, konnte von WILLERS und Mitarbeitern gezeigt werden, dass der angenommene Inhibitor offensichtlich die Inaktivierung von C'_3 nicht aber die Bildung des PZ Komplexes hemmt. Ist also der für die Hemmung der C'_3 Inaktivierung verantwortliche Inhibitor in einem Serum vorhanden, so sind die mit der klassischen Titration gefundenen Properdinwerte zu niedrig, bzw. es wird ein Fehlen von Properdin vorgetäuscht. Vermutet man bei niedrigen Properdinwerten eine Inhibierung, so wird von den Autoren folgendes Vorgehen vorgeschlagen.

RP Serum und Zymosan werden zu Verdünnungen des vermutlich inhibitorhaltigen Testserums zugegeben und die Mischungen 75 Minuten bei 17°C inkubiert, um die Bildung des PZ Komplexes zu ermöglichen. Bis hierher stimmt ihr Vorgehen mit dem LEONS überein, der seine Vorschläge allerdings auf Grund anderer Vorstellungen (siehe Seite 21/22) gemacht hatte. Jetzt wird der abzentrifugierte PZ Komplex nach einmaligem Waschen mit vorgekühlter Pufferlösung einem frischen RP Serum zugesetzt, das natürlich inhibitorfrei sein muss. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wird der Abfall der Haemolyse (System sensibilisierter Schaferythrozyten) als Mass der C'_3 Inaktivierung bestimmt.

Das mit dem RP Serum eingeführte C'_3 und das C'_3 des Testserums sowie die in beiden Seren vorhandenen Cofaktoren, welche die Inaktivierung von C_3 in der zweiten Stufe stören können, werden durch die Inkubation in der Kälte und durch das Verwerfen des Überstandes nach dem Abzentrifugieren von PZ ausgeschaltet.

Das anschliessend für die C'_3 Bestimmung verwendete RP Serum ist geprüft und inhibitorfrei. Mit dieser Methodik fanden sich bei Seren, die mit der Modifikation ISLIKERS und mit der Modifikation zur Bestimmung des Gesamtproperdins von LEON ein vermindertes oder gar kein Properdin aufwiesen, tatsächlich höhere Properdinwerte.

Als Kontrolle wurde von den Autoren die oben skizzierte Methodik in einem Punkt geändert. Bei sonst gleichen Vorgehen wurde das RP Serum bei der Inkubation mit Zymosan weggelassen. Diese Änderung entspricht der Bestimmung der "available Properdin", wobei gleichzeitig die mögliche Beeinflussung der PZ Bildung durch Cofaktoren ermittelt bzw. ausgeschaltet wird. Die mit der Kontrolle gefundenen Properdintiter waren naturgemäss niedriger als mit der o. a. Methodik, in keinem Fall aber wurde ein völliges Fehlen von Properdin beobachtet. Ein Mangel des Komplementfaktors C'_2 , der bei menschlichen Seren häufig für die Limitierung der Komplementwirksamkeit verantwortlich zu machen ist, wird von den Autoren bei sonst niederen Properdinwerten nicht angenommen.

Fehlt der nachgewiesene Inhibitor in einem Serum, so wurden mit der Modifikation ISLIKERS, der Modifikation der Autoren und mit der Kontrollbestimmung (available Properdin) in zahlreichen Fällen gleiche Properdinwerte gefunden. Jedoch kann nach Ansicht von WILLERS und Mitarbeitern die Möglichkeit, dass die Inaktivierung von C'_3 für die scheinbar hohen Properdinwerte verantwortlich ist, nicht ausgeschlossen werden. Die Schwierigkeit in der Durchführung ihrer Methodik sehen die Autoren in der Gewinnung inhibitorfreier RP Seren. Diese Seren wurden aus einem "Serumpool" von 100 Seren gewonnen, wobei bevorzugt solche genommen wurden, die bei der üblichen Properdinbestimmung hohe Properdintiter aufwiesen.

Mit der oben beschriebenen Methodik wird nach den heutigen wissenschaftlichen Vorstellungen das Gesamtproperdin bestimmt. Die Wirkung eines Inhibitors wird ausgeschaltet und die von LEON vorgebrachten Bedenken gegenüber der klassischen Titration werden berücksichtigt. Die Möglichkeit, dass auch die PZ Bindung durch einen Inhibitor gestört werden kann, besteht, bislang hat man aber noch keinen Anhalt dafür gefunden.

WILLERS, PONDMAN und WINKLER haben mit ihrer Modifikation auch in den Seren verschiedener Tierarten Properdin bestimmt. Dabei konnten sie bei Meerschweinchen Properdintiter bis zu 32 Einheiten nachweisen, was in auffälligem Gegensatz zu den Befunden anderer Autoren steht, nach denen Meerschweinchen den niedrigsten Properdintiter aller untersuchten Tierarten aufweisen. Die niedrigsten Properdinwerte (1 - 2 Einheiten) wurden von WILLERS und Mitarbeitern bei Hühnchen gefunden, bei denen es bislang nicht gelungen war, Properdin nachzuweisen.

Da die Autoren die Bestimmung des available Properdin für biologisch bedeutsamer erachten als die Bestimmung des Gesamtproperdins, messen sie dem nachgewiesenen Inhibitor eine grössere Bedeutung als dem Properdin zu. Diese Betrachtungsweise wirft unseres Erachtens ein völlig neues Licht auf die Problematik des Properdins und seine Bestimmung im Serum von Kranken. Es erscheint uns aber doch verfrüht, einem immerhin nur in 25 % aller Seren (nach WILLERS und Mitarbeitern) vorkommenden Inhibitor eine solche Bedeutung zumessen zu wollen.

2) BESTIMMUNG VON PROPERDIN MIT INULIN NACH McNALL (34).

Da sich Properdin mit gastrischen Muzinen, Bakterienzellmembranen, bakteriellen Carbohydraten und mit verschiedenen Substanzen aus der Polysaccharidreihe (Levane, Dextrane) bindet (33), wurde von McNALL vorgeschlagen, Properdin mittels Inulinbindung (PI Komplex) zu messen (34). Inulin ist ein stärkeähnliches Kohlehydrat, das aus Dahlienwurzeln gewonnen werden kann. Inulin kann in höheren Konzentrationen benutzt werden als Zymosan. Es soll nach McNALL auch nicht bei der Herstellung von R_3 Seren noch andere Komplementkomponenten als C'_3 , wie es bei Zymosan möglich ist, absorbieren. HEISE (35) und FRITZSCHE und Mitarbeiter (15) konnten aber bei Properdinbestimmungen mit den von ihnen verwendeten Inulinen die Ergebnisse McNALLS nicht bestätigen. Nach ihren Untersuchungen kann Inulin das Zymosan bei der Properdinbestimmung nicht ersetzen, da C'_3 durch den PI Komplex nur ungenügend inaktiviert wird.

3) ANDERE METHODEN DER PROPERDINBESTIMMUNG.

Um die Schwierigkeiten der Properdinbestimmung in Tierseren umzugehen, haben KENT, TOUSSAINT und HOOK Methoden angegeben, die im wesentlichen auf der Verwendung homologer Testseren beruhen (17).

Eine mikroanalytische Stickstoffbestimmung des PZ Komplexes wurde noch von ISLIKER und LINDER (14) zur Messung von Properdin vorgeschlagen. Wegen der komplizierten Technik und verschiedener Fehlermöglichkeiten - unter anderem ist es wegen des hohen N Gehaltes des Zymosans nicht möglich, den geringen N Gehalt von Properdin ausreichend genau zu bestimmen - kommt diese Methode zur Routine nicht in Frage.

Vorläufige Erfahrungen mit einer quantitativen Methode der Serumproperdinbestimmung auf der Basis einer Stickstoffbestimmung des Properdin-Inulin-Komplexes wurden kürzlich von SCHEIFFARTH und Mitarbeitern (54) mitgeteilt. Da das methodische Vorgehen der Autoren in allen Einzelheiten noch nicht veröffentlicht ist, kann das Verfahren noch nicht beurteilt werden.

PILLEMER und Mitarbeiter (36) haben eine Properdinmessung mittels Lyse von mit Tannin behandelten Erythrozyten in Erwägung gezogen. Es hat sich aber herausgestellt, dass diese Methode nicht geeignet ist, Properdin zu bestimmen, da noch unbekannte Faktoren an der Haemolyse beteiligt sind. Sie ist nur zur Prüfung der Reinheit von Properdinpräparaten zu verwenden. Hinsichtlich der Ergebnisse bei Properdinbestimmungen fanden die Autoren keine Übereinstimmung mit dem Zymosanverfahren.

Eine Bestimmung des Properdins durch Titration mit einem spezifischen Anti- Properdinserum wurde noch von PILLEMER selbst (37) versucht, jedoch hat die Methode bis heute noch zu keinen brauchbaren Ergebnissen geführt. Ihre Schwierigkeiten liegen unter anderem in der Gewinnung eines weitgehend gereinigten Properdinpräparates, das zur Immunisierung der Tiere geeignet ist.

Schliesslich wurde noch von BARLOW, v. VUNAKIS und LEVINE (46) eine Messverfahren für Properdin ausgearbeitet, das auf der Neutralisation der Bakteriophagenwirkung durch Properdin beruht. Auch diese Methode erscheint noch fraglich und bedarf der weiteren Bestätigung.

V. EIGENE VERSUCHE.

Zur Bestimmung von Properdin bei Dermatosen verwendeten wir die von FRITZSCHE, FISCHER, SCHULTZE und SCHWICK (15) angegebene Modifikation der PILLEMER'schen Methode, deren Technik wir dankenswerter Weise im Laboratorium der I. Medizinischen Universitätsklinik München studieren durften.

Wie schon erwähnt, haben FRITZSCHE und Mitarbeiter ihre Modifikation auf zwei Hauptgesichtspunkten aufgebaut. Bei PILLEMERS Methode wird der C'_3 Zuwachs durch das Testserum nicht berücksichtigt. Durch die Zufuhr von C'_3 aus dem Testserum kann aber das RP Serum mehr C'_3 bekommen, als das vorhandene Properdin binden kann, so dass Fälle eintreten können, bei denen $1\frac{1}{2}$ - 2 Einheiten Properdin die unterste Grenze der Messbarkeit darstellen. Zum zweiten ist die völlige Lyse wie die völlige Nichtlyse eines haemolytischen Systems (PILLEMERS Vorgehen) bei der Titrierung mit mehr Unsicherheit einzustellen wie die 50 %-Haemolyse.

Wir selbst haben die Modifikation von FRITZSCHE und Mitarbeitern in einigen Punkten geändert und gingen im einzelnen wie folgt vor (zum Teil nach unveröffentlichten Angaben von LANG).

1) ABNAHME DES PATIENTENBLUTES.

Das Blut wurde unter sterilen Kautelen, nach Möglichkeit nüchtern und vor Beginn einer Behandlung, abgenommen und in sterile Röhrchen gegeben. Nach der Abnahme wurde das Blut eine Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann zentrifugiert und das Serum in sterile Röhrchen abgegossen. Anschliessend wurde das gewonnene Serum sofort bei -20°C eingefroren. Für eine Properdinbestimmung braucht man mindestens 3 ml Serum.

2) VERWENDETE GERÄTE.

Glasröhrchen 9 x 0,9 cm.

Erlenmeyerkölbchen 50 und 100 ml.

Messzylinder 100 ml.

Zentrifugierglas geeicht, 15 ml.

Glasstab 2 mm $\varnothing$ zum Anteigen von Zymosan.

Pipetten 0,1 ml, 1 ml, 10 ml.

Eppendorf-Spektralphotometer mit 2 Spezialküvetten 10 mm $\varnothing$.

Zentrifuge 3 500 U/max.

Doppelt Log. Millimeterpapier.

3) REAGENZIEN.

RPT - Serum (Removed Properdin-Trockenserum) der Behringwerke
Charge Nr. 56 G und Nr. 61.

R 3 - Trockenserum (C'_3 freies Serum) der Behringwerke
Charge Nr. 57 C und Nr. 58 E.

Beide Trockenserum sind nach den Angaben der Hersteller bei Aufbewahrung bei $+4^{\circ}\text{C}$ drei Monate haltbar. Unsere Chargen waren bei ihrer Verwendung etwa 4 - 6 Wochen alt.

Zymosan Behringwerke Op. -Nr. 23 A und Nr. 27.

Michaelis Puffer pH 7,35 mittels Glaselektrode eingestellt.

Der Puffer wurde folgendermassen hergestellt:

Zusammensetzung: 85,0 g NaCl

5,75 g 5,5-Diäthylbarbitursäure

3,75 g Natrium-5,5-Diäthylbarbiturat

5,0 g MgCl_2

1,5 g CaCl_2

Die Lösung der Säure erfolgt in 500 ml heissem dest. Wasser, während die anderen Zusätze in kaltem dest. Wasser gelöst werden. Das Gesamtvolumen der Mischung wird mit dest. Wasser auf 2 000 ml gebracht. Der Puffer wurde in einem dunklen Glas bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Jeweils vor Gebrauch wird eine 1 : 5 Verdünnung dieses Puffers in dest. Wasser vorgenommen.

Hammelblutkörperchen (arteriell - venös gemischt), durch Schütteln mit Glasperlen defibriniert.

Ambozeptor Titer bis 4 000, Prüf. Dat. 6.8.59 Nr. 3307.

Aktives Humanmischserum (jeweils 1 Tag alt, seronegativ).

Phys. NaCl-Lösung.

Aqua bidest.

4) VORVERSUCHE.

a) Herstellung des haemolytischen Systems.

Vor jeder Properdinbestimmung wurde das Hammelblut nach Abzentrifugieren des Serums dreimal mit phys. NaCl-Lösung gewaschen. Dazu wurden etwa 20 ml Hammelblut im Zentrifugenglas markiert, bis 60 ml mit phys. NaCl-Lösung aufgefüllt, gründlich gemischt, zentrifugiert und dann der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe bis zur Marke abgezogen. Die so gewonnenen Erythrozyten wurden im sterilen Röhrchen bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Bei ihrer Verwendung waren sie entweder frisch oder maximal bis zu drei Tagen alt.

FRITZSCHE und Mitarbeiter (15) haben ihr haemolytisches System auf eine Bezugskurve eingestellt, wobei eine 100 %ige Haemolyse bei der photometrischen Messung eine Extinktion von 0,4 ergab. Die übrigen Werte für die Bezugskurve wurden erhalten, indem ansteigende Mengen der ursprünglich auf 2,5 % eingestellten Erythrozytensuspensionen mit phys. NaCl-Lösung verdünnt und die entsprechenden Extinktionen bestimmt wurden.

Da wir bei unseren Versuchen Erythrozyten von jeweils verschiedenen Hammeln verwendeten, wurde jedesmal diejenige Erythrozytenkonzentration gesucht, die bei kompletter Haemolyse im Eppendorf-Spektralphotometer (Wellenlänge 546 m μ) Messung gegen phys. NaCl-Lösung eine Extinktion von 0,5 ergab. Die Extinktion von 0,5 haben wir in Übereinstimmung mit LANG (48) gewählt, um die Rechnung zu vereinfachen. Um die entsprechende Erythrozytenkonzentration zu ermitteln, gingen wir wie folgt vor.

Von den gewaschenen Erythrozyten wurde eine 1 : 10 Verdünnung hergestellt (18,0 ml phys. NaCl-Lösung + 2,0 ml Erythrozyten). Der Ambozeptor wurde 1 : 10 verdünnt (1,8 ml phys. NaCl-Lösung + 0,2 ml Ambozeptor Titer 1/4 000).

Von der Erythrozytenverdünnung 1 : 10 wurde eine Verdünnungsreihe von 0,82 % bis 2 % angelegt. (Entspricht 8,98 ml phys. NaCl-Lösung bis 7,8 ml bei einem Gesamtvolumen von 10 ml.) Diese Erythrozyten wurden durch Zugabe von 0,2 ml der Ambozeptorverdünnung sensibilisiert. (Entspricht ca. 8 Einheiten Ambozeptor/ml.)

Nun wurde jeweils 1,0 ml der sensibilisierten Erythrozyten mit 0,5 ml frischem, aktiven, komplementreichen, seronegativen Humanmischserum versetzt und die Ansätze ins Wasserbad von 37° C gebracht. Das Mischserum wird zweckmässigerweise vorher auf seinen Komplementreichtum geprüft. Nach 10 Minuten war stets in allen Röhrchen eine komplette Haemolyse zu beobachten. Sollte dies nicht der Fall sein, empfiehlt es sich, ein anderes Humanserum zu verwenden.

b) Bestimmung der Extinktion.

Nach erfolgter kompletter Haemolyse wurden für die photometrische Messung der Extinktion (Eppendorf-Spektralphotometer Wellenlänge 546 mμ) 0,9 ml der Hämoglobinlösung mit 1,8 ml phys. NaCl-Lösung in optische Spezialeküvetten (10 mm Ø) pipettiert, gut gemischt und nach vorheriger Eichung gegen phys. NaCl-Lösung die Extinktion in jedem Röhrchen bestimmt. Die Extinktionsmessung wurde für jede Verdünnungsstufe zweimal vorgenommen, um Pipettierfehler auszuschliessen. Je nach Konzentration und Hb-Gehalt der Hammelerythrozyten wurde mit einer 0,82 %igen bis 1,35 %igen Suspension bei kompletter Haemolyse eine Extinktion von 0,5 gefunden. Die gesuchte Konzentration erwies sich auch als abhängig vom Alter der Hammelerythrozyten. Mit steigender Alterung nahm die Fragilität der Erythrozyten und damit ihre Haemolysebereitschaft zu und somit die zur Extinktion von 0,5 erforderliche Konzentration ab.

Diese Abhängigkeit der Konzentration vom Alter zeigt die Tabelle 4.

Tabelle 4

Erythrozytenkonzentration zur Extinktion von 0,5 in Abhängigkeit vom Alter der Erythrozyten.

Alter der Erythrozyten	Bis 12 Std.	Bis 24 Std.	Bis 48 Std.	Bis 72 Std.
Erforderliche Konzentration	1,3 %	1,18 %	1,0 %	0,96 %

Im Durchschnitt von 15 Verdünnungsreihen lag die gesuchte Konzentration für einen Extinktionswert von 0,5 bei 1 %. Nachdem die erforderliche Erythrozytenkonzentration in der beschriebenen Weise ermittelt worden war, wurden 100 ml Erythrozytensuspension mit phys. NaCl-Lösung hergestellt und mit 0,2 ml Ambozeptor Titer 1/4000 (entspricht 8 E Ambozeptor/ml Suspension) sensibilisiert. Das Endvolumen der Suspension betrug stets 100 ml. Diese sensibilisierten Erythrozyten wurden nochmals auf ihre Extinktion geprüft und dann bis zu ihrer Verwendung bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Da die Erythrozyten bis zu drei Stunden im Eisschrank standen, wurde nach Beeindigung der Properdinbestimmungen nochmals eine Extinktionsmessung durchgeführt, um eine evtl. Empfindlichkeitsänderung der Erythrozyten zu erfassen. Diese Kontrolle ergab in allen Fällen wie zu erwarten exakt eine Extinktion von 0,5. Eine Änderung des Haemolysegrades der sensibilisierten Erythrozyten bei dreistündiger Aufbewahrung im Eisschrank war also nicht nachweisbar.

c) Eignungsprüfung des properdinfreien Serums (RP Serum).

Die von den Behringwerken gelieferten RP Seren entsprechen nach FRITZSCHE, SCHULTZE und Mitarbeitern den Forderungen PILLEMERS (siehe Seite 12). Die vom Hersteller geforderte RP Serum Eignungsprüfung, bei der das C'_3 des RP Serums vor und nach Zymosanzusatz bestimmt wird, ist nur dann erforderlich, wenn die RP-Chargen nach Ablauf der jeweils angegebenen Haltbarkeitsgrenze verwendet werden. Ob evtl. vorhandenes Properdin in den RP Seren mit zunehmender Alterung aktiviert wird bzw. ob die übrigen Komplementkomponenten $\text{C}_1 - \text{C}_4$ in ihren Titern verändert werden, bleibt offen. Nach einer Mitteilung von SCHULTZE (49) kann man die RP Eignungsprüfung weglassen, vorausgesetzt, dass die Haltbarkeitsgrenze der Chargen nicht überschritten wird. Genau genommen erfasst man also bei dieser RP Serum-Eignungsprüfung - die wir mit jeder Charge vorgenommen haben - evtl. Rest von Properdin, da die gemessene C'_3 Verminderung nach Zymosanbehandlung nur durch den PZ Komplex zustande kommen kann. Die Eignungsprüfung des RP Serums wurde entsprechend den Angaben von FRITZSCHE und Mitarbeitern (15) durchgeführt, nur wurde in Übereinstimmung mit LANG (48) bei den Testansätzen statt phys. NaCl-Lösung und Pufferlösung einheitlich nur Pufferlösung verwendet, um Änderungen des pH zu vermeiden.

Ein zur Properdinbestimmung geeignetes R_3 Serum (C'_3 freies Serum) kann durch Zymosanbehandlung eines Humanserums bei 37°C erhalten werden. Da aber nach PILLEMER (10) nur 15 % aller menschlichen Seren ein geeignetes R_3 Serum liefern, weil bei der Zymosanbehandlung oft auch C'_2 inaktiviert wird, nimmt man nach FRITZSCHE und Mitarbeitern (15) zweckmäßigerweise Mischseren von Meerschweinchen. Da beim Meerschweinchen der C'_2 Titer gewöhnlich viel hö-

her ist als beim Menschen, führt auch eine längere Zymosanbehandlung noch zu einem brauchbaren R_3 Serum. Die von den Behringwerken gelieferten R_3 Trockenserum vom Meerschweinchen entsprechen den Forderungen PILLEMERS (siehe Seite 18) und müssen vom Untersucher nicht eigens geprüft werden.

d) Vorbereitung der Reagenzien.

Das RP Trockenserum wurde unmittelbar vor Gebrauch in 2 ml Aqua bidest., das R_3 Trockenserum in 4,5 ml phys. NaCl-Lösung gelöst und beide Seren bis zur endgültigen Verwendung bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Da bei Properdinbestimmungen (gleiches gilt für die RP Prüfung) stets Zymosan im Überschuss verwendet werden soll, wurden für jeweils zwei Bestimmungen 50 mg Zymosan mit der Analysenwaage abgewogen und in ein Glaskölbchen überführt. Tropfenweise wurden unter ständigem Rühren mit einem Glasstab etwa 15 ml phys. NaCl-Lösung zugegeben. Der vorsichtig angeteigte Brei wurde nun 30 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt, dabei öfters geschüttelt und nach Abkühlen eine halbe Stunde bei 3 500 U/Min. im graduierten Röhrchen zentrifugiert. Nach Abgiessen des Überstandes wurde phys. NaCl-Lösung bis 1,25 ml tropfenweise zugegeben, so dass 4 mg Zymosan (bezogen auf das Trockenpräparat) in 0,1 ml der Suspension enthalten waren. Die Zymosansuspension wurde jeweils am Tage der Properdinbestimmung frisch zubereitet und bis zu ihrer Verwendung bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. 10 ml Michaelispuffer wurden mit 40 ml Aqua bidest. verdünnt und ebenfalls bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die Vorbereitung der Erythrozytensuspension wurde bereits geschildert.

e) Durchführung der RP Serum-Eignungsprüfung.

Nach diesen Ausführungen erklärt sich der Gang der RP Eignungsprüfung am besten an Hand des folgenden Pipettierschemas. Das Schema zeigt, dass zwei vollkommen parallele Ansätze sämtliche Stufen durchlaufen.

I. Ansatz ohne Zymosan: 0,5 ml Puffer + 0,25 ml RP Serum.

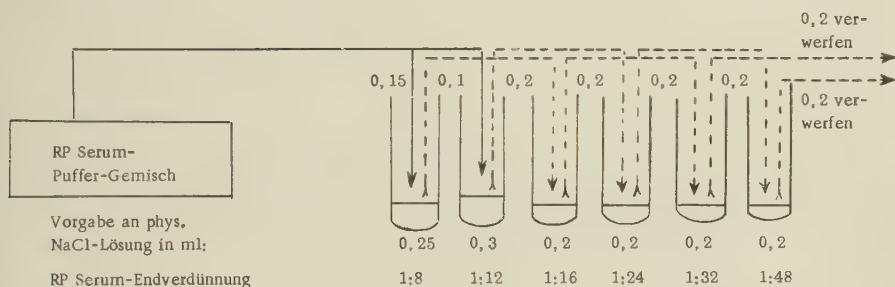
II. Ansatz mit Zymosan: 0,05 ml Zymosansuspension + 0,45 ml Puffer + 0,25 ml RP Serum.

Beide Ansätze werden im Wasserbad bei 37°C eine Stunde gehalten und das zymosanhaltige Röhrchen alle 10 Minuten gut geschüttelt, um eine optimale Bindung des Zymosans an etwaiges Properdin zu ermöglichen.

Nach Abzentrifugieren des Zymosans (30 Min. bei 3 500 U/Min.) im II. Ansatz wurde von beiden Ansätzen eine Verdünnungsreihe hergestellt, die in Abbildung 2 wiedergegeben ist.

Abbildung 2

Schema der Verdünnungsreihe für Ansatz I und II.



Anschliessend wurden in jedes der 6 Röhrchen jeder Verdünnungsreihe 0,1 ml R₃ Serum, 0,2 ml Puffer und 1,0 ml haemolytisches System gegeben, so dass das Gesamtvolumen in jedem Röhrchen 1,5 ml betrug.

Diese Haemolyseansätze wurden 30 Minuten bei 37° C im Wasserbad inkubiert und anschliessend zentrifugiert (5 Min. bei 2 000 U/Min.) und im Überstand die prozentuale Haemolyse bestimmt. Hierzu wird 0,9 ml klares Haemolysat vorsichtig von den nicht gelösten Erythrozyten abpipettiert, direkt in der Küvette mit 1,8 ml phys. NaCl-Lösung verdünnt (Endverdünnung 1 : 3), gut gemischt und bei 546 mμ die Extinktion gegen phys. NaCl-Lösung bestimmt. Das Spektralphotometer wurde bei jeder Messung geeicht, um die durch die Empfindlichkeit des Apparates auftretenden Abweichungen auszukorrigieren.

Die durch ansteigende Mengen vom Komplement hervorgerufene Haemolyse weist lediglich im Bereich der 50 %-Haemolyse ein etwa annähernd proportionales Verhalten zwischen Komplementmenge und Haemolysegrad auf. Um daher Properdin exakt zu bestimmen, muss die Serumverdünnung ermittelt werden, durch die eine 50 %-Haemolyse bewirkt wird. Die betreffende Serumverdünnung (bzw. Serummenge) wird als 50 %-Haemolyseeinheit bezeichnet. Die genaue Ermittlung der Serumverdünnung erfolgt graphisch, indem man auf der Ordinate eines doppelt logarithmischen Millimeterpapiers die prozentuale Haemolyse und auf der Abszisse den entsprechenden Serumverdünnungsgrad aufträgt.

Da bei einiger Übung der Bereich der 50 %-Haemolyse vom Untersucher bereits makroskopisch an der hellrosa Tönung des Haemolysates erkannt werden kann, genügt es im allgemeinen, nur zwei Haemolysate auf ihre Extinktion zu messen. Die

zwei Messpunkte - der eine möglichst über der 50 %-Haemolyse und der zweite unter der 50 %-Haemolyse - lassen sich durch eine Gerade verbinden und ergeben, am Schnittpunkt der 50 %-Haemolyse auf die Abszisse projiziert, genau die Serum- (bzw. RP-) Verdünnung, die der 50 %-Haemolyseeinheit entspricht. In Tabelle 5 und Tabelle 6 sind die Ergebnisse der von uns geprüften RP Serum-Chargen wiedergegeben. Abbildung 3 zeigt die graphische Bestimmung der 50 %-Haemolyseeinheit.

Tabelle 5

Messwerte der RP Charge Nr. 56G.
(R₃ Nr. 57C; Erythrozytenkonzentration 1,32 %)

RP Serum-Verdünnung		1 : 8	1 : 12	1 : 16	1 : 24	1 : 32	1 : 48	50% HE	C ₃ E
A	Extinktion			0,3		0,2		22	110
	%-Haemolyse			60		40			
AZ	Extinktion			0,28		0,2		20	100
	%-Haemolyse			56		40			

A = Ansatz ohne Zymosan;

AZ = Ansatz mit Zymosan;

50 % HE = 50 %-Haemolyse-Einheit.

Tabelle 6

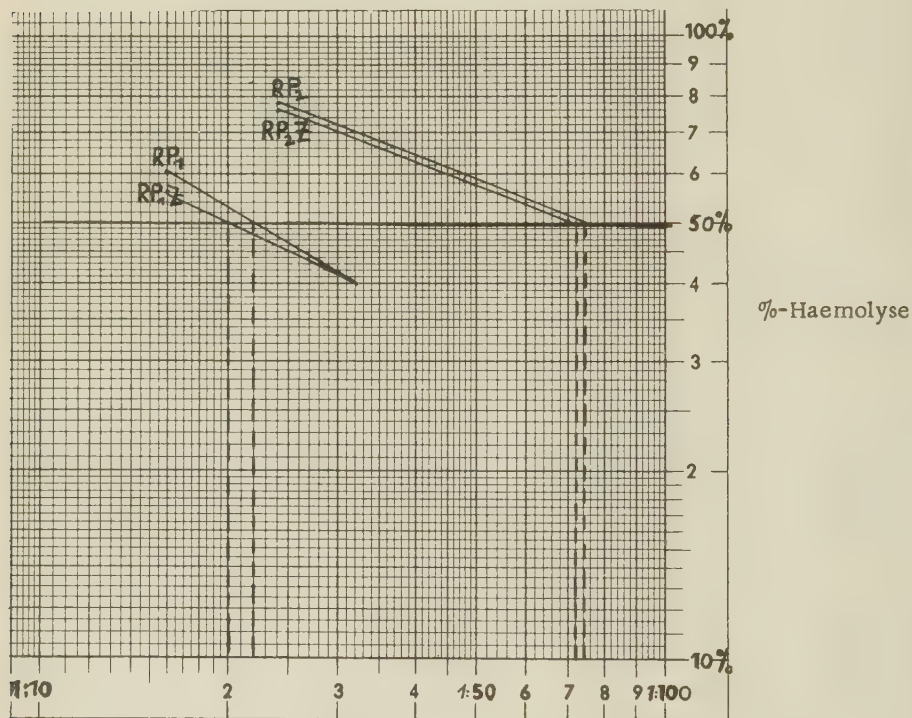
Messwerte der RP-Charge Nr. 61 (R_3 Nr. 58E; Erythrozytenkonz. 0,86%)

RP Serum-Verdünnung	1:8	1:12	1:16	1:24	1:32	1:48	50% HE	C_3 E
A — Extinktion				0,39		0,30	74	370
A — %-Haemolyse				78		60		
AZ — Extinktion				0,38		0,295	72	360
AZ — %-Haemolyse				76		59		

Da die eingestellte Extinktion von 0,5 = 100 %-Haemolyse ist, erhält man den prozentualen Haemolysegrad durch Multiplikation der abgelesenen Extinktion mit 200. Die aus Abbildung 3 bestimmten 50 %-Haemolyseeinheiten sowie die auf ein Milliliter RP Serum berechneten C_3^* Titer sind der Übersicht halber in Tabelle 5 und Tabelle 6 eingefügt.

Abbildung 3

Graphische Bestimmung der 50 %-Haemolyseeinheiten der beiden geprüften RP-Chargen.



RP-Endverdünnung

- RP₁ = RP-Charge 56 G
 RP₂ = RP-Charge 61
 Z = Ansatz mit Zymosan

Die zwei Messpunkte - einer oberhalb und einer unterhalb der 50 %-Haemolyse - werden durch eine Gerade verbunden, deren Schnittpunkt mit der 50 %-Haemolyse, auf die Abszisse projiziert, die der 50 %-Haemolyse-Einheit entsprechenden RP-Serum-Verdünnung ergibt. Bei RP_2 wurde die 50 % HE durch Verlängerung der beiden Geraden bis zum Schnittpunkt mit der 50 %-Haemolyse gefunden.

Mit Hilfe der 50 %-Haemolyse-Einheit lässt sich die C'_3 Aktivität des ursprünglichen, unverdünnten RP Serums leicht ausdrücken. Man hat dazu lediglich den Verdünnungsgrad und die Menge des verwendeten verdünnten Serums zu berücksichtigen. Hat man z.B. wie bei unserem RP Serum Nr. 56G mit 0,2 ml des 1 : 22 verdünnten Serums eine 50 %-Haemolyse erzielt, so bedeutet das, dass die 50 %-Haemolyse-Einheit 22 beträgt, denn unverdünntes Serum ist etwa 22mal so aktiv. Da man aber stets auf 1 ml unverdünntes Serum berechnet, muss noch mit 5 multipliziert werden. 1 ml des unverdünnten RP Serums hat somit in 50 %-Haemolyse-Einheiten ausgedrückt, einen Titer von 110 Einheiten C'_3 im Ansatz ohne Zymosan. Der Zymosanansatz ergab 100 E C'_3 , analoge Verhältnisse ergaben sich bei der zweiten RP-Charge. Die von uns geprüften beiden RP-Chargen ergaben jeweils über 100 Einheiten liegende C'_3 Titer und eine unter 5 % liegende Verminderung der C'_3 Titer nach Zymosanbehandlung. Sie erwiesen sich somit als zur Properdinbestimmung geeignet.

5) PROPERDINBESTIMMUNG BEI PATIENTENSEREN.

a) Vorbereitung der Reagenzien

In welcher Weise Zymosan, RP Serum, R_3 Serum und die Hammelerythrozyten vorbereitet werden, wurde bereits geschildert. Die zu untersuchenden Patientenserum wurden nach dem Auftauen (Wasserbad bei $37^{\circ}C$) mittels steriler Pipette sehr sorgfältig gemischt. Dieses Mischen ist sehr wichtig, da sich durch den Prozess des Einfrierens die verschiedenen Eiweißkörper entsprechend ihrer Schwere in Schichten absetzen. Die einzelnen Schichten sind bei genauer Beobachtung eines eingefrorenen Serums deutlich zu erkennen.

Da man von vornherein nicht weiss, wie viel Properdin in dem zu testenden Serum vorhanden ist, muss man verschiedene Verdünnungen (z.B. unverdünnt, 1 : 2, 1 : 4) mit phys. NaCl-Lösung anlegen. Ferner ist es möglich, dass schon ein Teil des Properdins alles C'_3 inaktiviert und somit zu niedrige Properdinwerte gemessen würden. Da bei warmen Aussentemperaturen Störungen bei der Properdinbestimmung auftreten sollen (47), wurden auch die für die Verdünnungsreihen benötigten Röhrchen samt der Vorgabe von phys. NaCl-Lösung bei $+4^{\circ}C$ kühl gestellt.

b) Ausführung der Methode.

Die Properdinbestimmung ist eine Bestimmung der C'_3 Aktivität, die sich zur Zymosanbehandlung um einen Betrag vermindert, der dem vorhandenen Properdin entspricht.

In Abweichung von der PILLEMER'schen Technik werden bei der Modifikation von SCHULTZE, FRITZSCHE und Mitarbeiter (15), die wir für unsere Versuche verwendeten, zwei Ansätze ausgeführt, einer mit Zymosan und einer ohne Zymosan. Es ist hierdurch möglich, das mit dem Testserum eingeschleppte C'_3 zu erfassen und Properdin exakt zu messen. Die drei Testserumverdünnungen werden einem properdinfreien Serum zugesetzt, das einen ausreichend hohen C'_3 Titer hat. In Übereinstimmung mit PILLEMER wurden dazu 0,25 ml RP Serum verwandt.

In welcher Weise die einzelnen Reagenzien angesetzt werden, ist in Tabelle 7 wiedergegeben.

Tabelle 7

Schema der Testansätze mit und ohne Zymosan.

Ansatz ohne Zymosan

Röhrchen A	0,25 ml	Michaelis Puffer	+0,25 ml	TS unverd.	+0,25 ml	RPS
Röhrchen B	0,25 ml	"	"	+0,25 ml TS 1 : 2	+0,25 ml	RPS
Röhrchen C	0,25 ml	"	"	+0,25 ml TS 1 : 4	+0,25 ml	RPS

Ansatz mit Zymosan

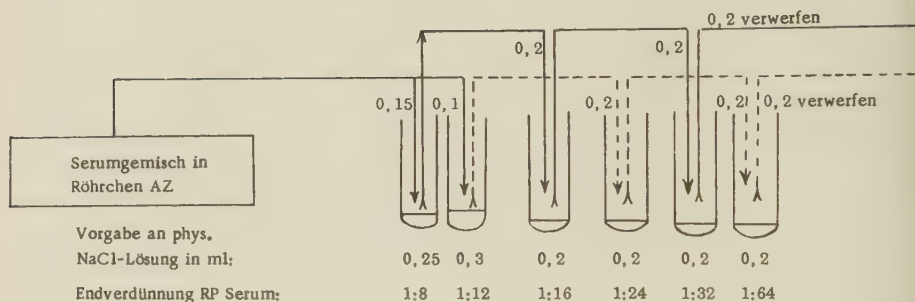
Röhrchen AZ	0,2 ml	M.P.	+0,05 ml	ZS	+0,25 ml	TS unverd.	+0,25 ml	RPS
Röhrchen BZ	0,2 ml	"	+0,05 ml	ZS	+0,25 ml	TS 1 : 2	+0,25 ml	RPS
Röhrchen CZ	0,2 ml	"	+0,05 ml	ZS	+0,25 ml	TS 1 : 4	+0,25 ml	RPS

M.P.	=	Michaelis Puffer
TS	=	Testserum
ZS	=	Zymosansuspension
RPS	=	RP Serum

Alle verwendeten Reagenzien waren bei +4° C vorgekühlt.

Abbildung 5

Pipettierschema der Testansätze mit Zymosan.



Nun folgt die Bestimmung der C'_3 Aktivität der verschiedenen Verdünnungen der Ansätze mit und ohne Zymosan. Zu jedem der jetzt für die C'_3 Bestimmungen vorliegenden 36 Röhrchen aus beiden Ansätzen werden 0,1 ml R_2 Serum, 0,2 ml Puffer und 1,0 ml haemolytisches System analog der RP Serum-Eignungsprüfung zugegeben. Das Gesamtvolumen eines jeden Röhrchens beträgt also 1,5 ml. Die zugesetzten Reagenzien sind alle bei $+4^\circ\text{C}$ vorgekühlt. Alle Röhrchen werden gut geschüttelt. Diese Haemolyseansätze wurden 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert, anschliessend zentrifugiert (5 Min. bei 2 000 U/Min) und im Überstand die prozentuale Haemolyse für jede der 6 Reihen in der bei der RP Serum-Eignungsprüfung beschriebenen Weise (siehe Seite 35) bestimmt.

Da eine Extinktion von 0,5 einer 100 %igen Haemolyse entspricht, werden die den gemessenen Extinktionen entsprechenden Haemolysegrade durch Multiplikation des Extinktionswertes mit 200 erhalten ($0,5 \times 200 = 100\%$).

Die 50 %-Haemolyseeinheiten für unverdünntes, 1 : 2 und 1 : 4 verdünntes Testserum aus dem Ansatz ohne und mit Zymosan werden auf graphischem Weg analog der RP Serum-Eignungsprüfung (Abbildung 3) ermittelt. Da der auf graphischem Weg ermittelte Wert der 50 %-Haemolyse mit 0,2 ml Serum erreicht wurde, und da die C'_3 Titer stets auf 1 ml Serum bezogen werden, muss der 50 %-Haemolysewert mit 5 multipliziert werden. Damit sind die C'_3 Einheiten in einem Milliliter Testserum bestimmt. Zur Erläuterung des Gesagten wird das Messprotokoll einer

Properdinbestimmung (Serum Nr. 7, RP-Charge 56G, R₃-Charge 57C, Erythrozytenkonzentration 0,95 %) und die zugehörige graphische Ermittlung der 50 %-Haemolyseeinheiten wiedergegeben.

Tabelle 8 zeigt die Ergebnisse des Ansatzes ohne Zymosan. Die aus der Abbildung 6 entnommenen 50 %-Haemolysewerte sind der Übersicht halber in Tabelle 8 (und Tabelle 9) enthalten.

Tabelle 8

Prozentuale Haemolysegrade der Testserumverdünnungen beim Ansatz ohne Zymosan.

Endverdünnung RP Serum	1:16	1:24	1:32	1:48	1:64	1:96	50% HE	C ₃ E
Serumgemisch in Röhrchen A (enthält Testse- rum unverdünnt)					57	39	72	370
Serumgemisch in Röhrchen B (enthält Testse- rum 1:2)				62	50		64	320
Serumgemisch in Röhrchen C (enthält Testse- rum 1:4)				61	47		60	300

Die Tabelle 8 zeigt, dass mit zunehmender Testserumverdünnung die 50 %-Haemolyse-Einheiten und damit die daraus errechneten C₃ Titer abnehmen. FRITZSCHE und SCHULTZE (15) haben in ihrer Publikation keine Erklärung für diese Erscheinung gegeben. Wir möchten annehmen, dass die unterschiedlichen C₃ Titer bei unverdünntem, 1:2 und 1:4 verdünntem Testserum die Fehlerbreite der Methode darstellen und zwar aus den folgenden Gründen. Zur Erzielung einer 50 %igen Haemolyse ist bei konstanten Versuchsbedingungen jeweils die gleiche

C'_3 Menge notwendig. Aus Tabelle 8 ist ersichtlich, dass nur die Verdünnungsgrade des RP Serums und des Testserums variieren, das heisst, man wird den Wert für die 50 %-Haemolyse bei zunehmender Testserumverdünnung in geringeren Verdünnungsgraden des Gesamtserumgemisches (Testserum + RP Serum + Puffer) finden.

Berechnet man nun den prozentualen Abfall der C'_3 Titer statt aus der Differenz der C'_3 Einheiten im Ansatz mit und ohne Zymosan für jede Testserumverdünnung nur aus der Differenz zum Mittelwert der C'_3 Titer im Ansatz ohne Zymosan, so ergibt sich für die Properdineinheiten in unseren Versuchen ein Unterschied von 0,1 bis 2 Einheiten Properdin. Bei unseren Properdinbestimmungen betrug der Unterschied der C'_3 Titer von A nach C 20 - 250 Einheiten C'_3 ! Die unter Benutzung des Mittelwertes der C'_3 Einheiten (ABC/3) errechneten Properdineinheiten wichen aber von den Properdinwerten, die jeweils aus den einzelnen C'_3 Differenzen berechnet wurden, nur um 0,1 bis 2 Einheiten ab. Die unterschiedlichen C'_3 Titer in Tabelle 8 stellen also die Fehlerquelle der Methode dar.

Tabelle 9 gibt die Ergebnisse des Ansatzes mit Zymosan wieder. Wie auch in Tabelle 8 sind hier die aus Abbildung 6 entnommenen 50 %-Haemolysewerte der Übersicht halber mit eingetragen.

Tabelle 9

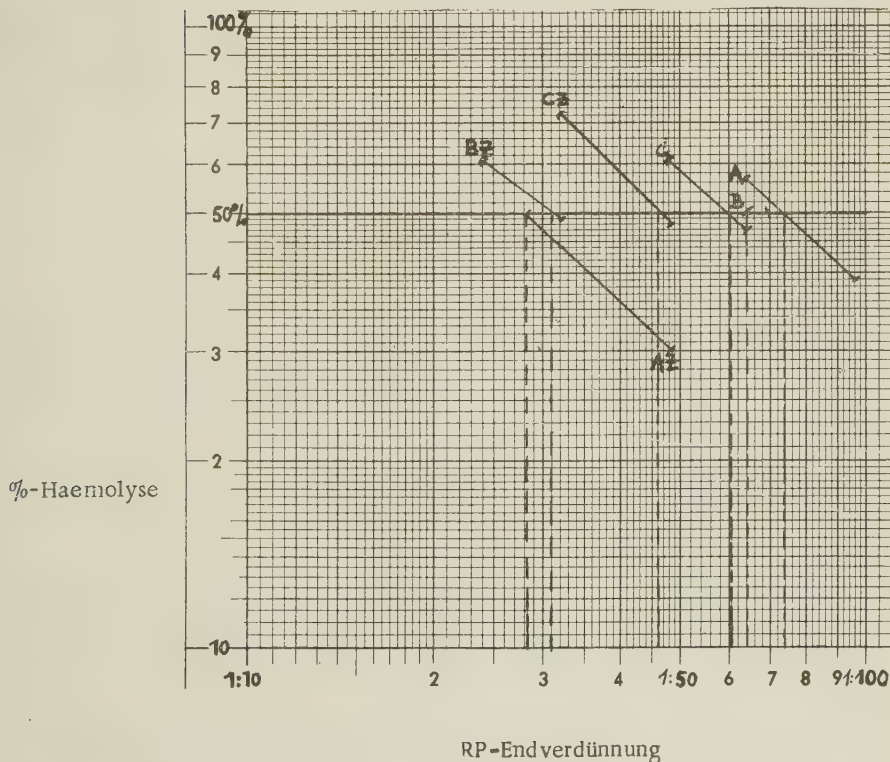
Prozentuale Haemolysegrade der Testserumverdünnungen beim Ansatz mit Zymosan.

Endverdünnung RP Serum	1:8	1:12	1:16	1:24	1:32	1:48	50% HE	C'_3 E
Serumgemisch in Röhrchen (enthält Testse- rum unverdünnt) AZ					44	30	28	140
Serumgemisch in Röhrchen BZ (enthält Testserum 1:2)				61	49		31	155
Serumgemisch in Röhrchen CZ (enthält Testserum 1:4)					72	48	46	230

Tabelle 9 zeigt, dass in unserem Beispiel der Properdintiter nicht so hoch war, dass das C'_3 des RP Serums und des Testserums durch den PZ Komplex völlig inaktiviert wurde, da bei unverdünntem Testserum immerhin noch 140 Einheiten C'_3 gemessen wurden. Die Zunahme der 50 %-Haemolyse-Einheiten (und damit auch der C'_3 Titer) bei ansteigender Testserumverdünnung erklärt sich daraus, dass je

Abbildung 6

Graphische Bestimmung der 50 %-Haemolyse-Einheiten für die Ansätze ohne und mit Zymosan.



weniger Properdin vorhanden ist (auf Grund der zunehmenden Testserumverdünnung), umso weniger C'_3 im Gemisch durch den PZ Komplex inaktiviert und damit für die Haemolyse verloren gehen kann. Je weniger Properdin also vorhanden ist, umso früher setzt die Haemolyse ein und um so höher liegen dann die 50 %-Haemolyse-Einheiten. Beim Ansatz mit Zymosan zeigt die Zunahme der C'_3 Titer innerhalb gewisser Schwankungen bei zunehmender Testserumverdünnung den richtigen Ablauf der Reaktion an.

Die Bestimmung der 50 %-Haemolyse-Einheiten erfolgt analog den bei der RP Serum-Eignungsprüfung gemachten Angaben. Bei der Reihe AZ wurde die Gerade aus den beiden unter der 50 %-Haemolyse liegenden Punkten bis zum Schnittpunkt mit der 50 %-Haemolyse verlängert.

c) Berechnung der Properdineinheiten.

PILLEMER hatte eine Einheit Properdin als die Menge bezeichnet, die in Gegenwart von optimalen Mengen Zymosan in einem Milliliter RP Serum während einer Inkubation von 60 Minuten bei 37°C $120 \pm 30 \text{ E } C'_3$ völlig inaktiviert, was bei seinem Vorgehen dem Röhrchen entspricht, in dem keine Haemolyse mehr nachweisbar ist.

Bei der Modifikation von FRITZSCHE, SCHULTZE und Mitarbeiter bezieht man die Properdineinheiten nicht auf die C'_3 Abnahme in einem Milliliter RP Serum, sondern auf die Abnahme des C'_3 in einem ml Testserum bei konstantem Gehalt von 0,25 ml RP Serum im Testansatz. Durch den Ansatz ohne und mit Zymosan wird der C'_3 Zuwachs durch das Testserum mit berücksichtigt. Die Berechnung von Properdin aus der Differenz der C'_3 Einheiten aus den beiden Ansätzen war auch deshalb erforderlich, weil bei Seren mit hohen oder niedrigen Properdintitern der unter Zugrundelegung der PILLEMER'schen Definition ermittelte Properdinwert sich als abhängig vom C'_3 Titer des Testserums erwies und parallel dazu anstieg oder abfiel. Properdin wird also nach FRITZSCHE und SCHULTZE aus der Differenz der C'_3 Titer beider Ansätze berechnet. Eine Einheit Properdin wird als die Menge bezeichnet, "die eine Abnahme von 50 % der C'_3 Aktivität in einem ml Testserum bei Gegenwart von 0,25 ml RP Serum bewirkt" (15).

Bei diesem Vorgehen können auch hohe Properdintiter bei gleichzeitig niedrigen C'_3 Titern des Testserums erfasst werden, da das Testserum bei dieser Methodik stets doppelt so stark verdünnt wird wie das RP Serum, also stets genügend C'_3 vorhanden ist.

Aus dem in Tabelle 8, Tabelle 9 und Abbildung 6 gegebenem Beispiel errechnet sich Properdin wie folgt.

Im Ansatz ohne Zymosan wurden mit Hilfe der 50 %-Haemolyse-Einheiten folgende C'_3 Aktivitäten berechnet.

Serumgemisch A (enthält Testserum unverdünnt)	345 E C'_3
Serumgemisch B (enthält Testserum 1 : 2)	320 E C'_3
Serumgemisch C (enthält Testserum 1 : 4)	300 E C'_3

Die gleichen Testbestimmungen ergaben im Ansatz mit Zymosan:

Serumgemisch AZ (enthält Testserum unverdünnt)	140 E C'_3
Serumgemisch BZ (enthält Testserum 1 : 2)	155 E C'_3
Serumgemisch CZ (enthält Testserum 1 : 4)	230 E C'_3

Die durch Properdin und Zymosan bedingte Abnahme an C'_3 beträgt:

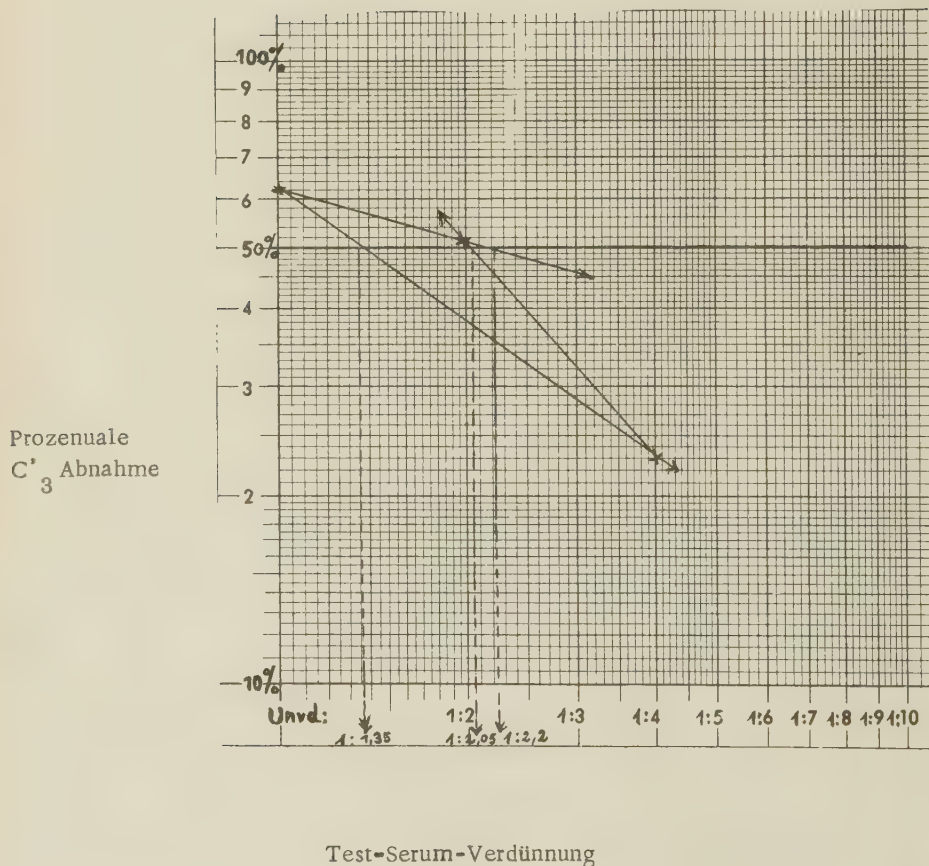
$$\begin{aligned}
 A - AZ &= 205 \text{ E } C'_3 = 59 \% C'_3 \text{ Abnahme} \\
 B - BZ &= 165 \text{ E } C'_3 = 51 \% C'_3 \text{ Abnahme} \\
 C - CZ &= 70 \text{ E } C'_3 = 25 \% C'_3 \text{ Abnahme}
 \end{aligned}$$

Nimmt man den Mittelwert der C'_3 Titer aus den Röhrchen ABC und zieht davon jeweils AZ, BZ, CZ ab, so ergeben sich 57 %, 51 % und 30 % C'_3 Abnahme.

Nach FRITZSCHE und Mitarbeiter werden die den einzelnen Testserumverdünnungen entsprechenden Properdineinheiten graphisch bestimmt (Abbildung 7).

Abbildung 7

Graphische Bestimmung der Properdineinheiten.



Auf der Ordinate eines doppelt logarithmischen Millimeterpapiers trägt man die prozentuale Abnahme der C'_3 Einheiten, auf der Abszisse die Testserumverdünnungen auf. Die drei Messpunkte ergeben eine Gerade, deren Schnittpunkt mit der 50 %igen C'_3 Abnahme auf die Abszisse projiziert, die in der Definition verlangte

Testserumverdünnung angibt. Durch Multiplikation mit 4 (Berechnung auf 1 ml Testserum) erhält man die Properdineinheiten in 1 ml Testserum. Aus Abbildung 7 ist ersichtlich, dass in dem gewählten Beispiel die drei Punkte nicht auf einer Geraden liegen und sich somit mindestens drei verschiedene Properdinwerte ablesen lassen.

Da es ausserdem vorkommen kann, dass die prozentuale C'_3 Abnahme der Verdünnungen höher ist als die des unverdünnten Testserums, ist die graphische Bestimmung der Properdineinheiten unseres Erachtens zu ungenau. Bei unseren Versuchen fanden wir die drei Werte niemals auf einer Geraden liegend. Da diese Gerade den in praxi kaum vorkommenden Idealfall darstellt, haben wir die Properdineinheiten einem Vorschlag von LANG (48) folgend nicht graphisch sondern durch Rechnung bestimmt. Da sich mit der geschilderten Methodik im Normalserum etwa 5 - 10 Einheiten Properdin ergeben und der ideale Normalwert wie auch bei PILLEMER bei 8 Einheiten/ml liegt, wurde die Properdinberechnung auf diesen Idealwert bezogen. Das heisst, bei unverdünntem Testserum wurde eine 100 %ige Abnahme von C'_3 gleich 8 Einheiten Properdin/ml, bei 1 : 2 verdünntem Testserum eine 50 %ige Abnahme gleich 8 E Properdin/ml und bei 1 : 4 verdünntem Testserum eine 25 %ige Abnahme gleich 8 Einheiten/ml gesetzt.

Rechenbeispiel:

Unverdünntes Testserum:	100 % C'_3 Abnahme = 8 E Prop. /ml 62 % C'_3 Abnahme = x <u>x = 4,96 Einheiten Properdin/ml.</u>
Testserum 1 : 2 verdünnt	50 % C'_3 Abnahme = 8 E Prop. /ml 51 % C'_3 Abnahme = x <u>x = 8,16 Einheiten Properdin/ml.</u>
Restserum 1 : 4 verdünnt	25 % C'_3 Abnahme = 8 E Prop. /ml 23 % C'_3 Abnahme = x <u>x = 7,36 Einheiten Properdin/ml.</u>
Der arithmetrische Mittelwert ergibt:	<u>6,82 Einheiten Properdin/ml.</u>

Setzt man die unter Benutzung des Mittelwertes der C'_3 Einheiten gefundenen prozentualen C'_3 Titerabnahmen in die Berechnung der Properdineinheiten ein, so ergeben sich in unserem Beispiel 7,44 Einheiten Properdin/ml. Der Unterschied beträgt also nur 0,62 Einheiten, die praktisch vernachlässigt werden können. Unser Rechenbeispiel zeigt auch, dass es nur durch verschiedene Testserumverdünnungen möglich ist, unterschiedliche Properdinwerte (vor allem erhöhte) zu erfassen, da sich aus unverdünntem Testserum nicht mehr als 8 Einheiten errechnen lassen.

6) ERGEBNISSE.

Die Ergebnisse unserer Properdinbestimmungen bei verschiedenen Dermatosen mit der geschilderten Methodik sind in Tabelle 10 wiedergegeben.

Tabelle 10

ERGEBNISSE DER PROPERDINBESTIMMUNG BEI DERMATOLEN.

Patient	Alter	Diagnose	Properdineinheiten
Nr. 1 R. J.	40 J.	Sklerodermia diffusa progressiva	5,4 E
Nr. 2 P. J.	64 J.	Mykosis fungoides	7,0 E
Nr. 3 H. W.	21 J.	Erythema exsudativum multiforme	9,6 E
Nr. 4 W. H.	69 J.	Erythema exsudativum multiforme	5,0 E
Nr. 5 B. J.	25 J.	Erythema exsudativum multiforme	6,3 E
Nr. 6 Sch. S.	5 J.	Epidermolysis bullosa hereditaria	10,3 E
Nr. 7 Sch. L.	9 J.	Epidermolysis bullosa hereditaria	12,4 E
Nr. 8 B. J.	45 J.	Alterspemphigus (Bull. Pemphigoid)	8,0 E
Nr. 9 S. A.	57 J.	Alterspemphigus (Bull. Pemphigoid)	11,52 E
Nr. 10 H. K.	63 J.	Furunkulose	6,56 E
Nr. 11 H. K.	55 J.	Furunkulose	14,2 E
Nr. 12 P. K.	26 J.	Acne conglobata	15,6 E

Da die Methode nach FRITZSCHE und Mitarbeitern beim Normalen zwischen 5 und 10 Einheiten Properdin/ml Testserum liefert, sind 8 Einheiten als der ideale Normalwert angenommen. Die methodische Fehlerbreite beträgt 2 - 3 Einheiten. Werte, die eindeutig unter 5 Einheiten oder über 10 Einheiten liegen, können als nicht mehr im Bereich der Norm liegend gewertet werden.

Nachdem wir bei verschiedenen Dermatosen Untersuchungen durchgeführt hatten, bemühten wir uns die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse anhand ausgesuchter Serien zu prüfen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 11 wiedergegeben.

Tabelle 11

Vergleichende Properdinbestimmungen bei ausgesuchten Versuchspersonen.

Versuchsperson	Alter	Datum	Properdineinheiten/ml	RP Charge
Nr. A Sch.H. Kontrolle	29 J.	22.1. 9.3.	2,0 E (k) 4,3 E	Nr. 56 G Nr. *61
Nr. B Sch.M. Kontrolle	29 J.	22.1. 9.3.	6,0 E (k) 6,0 E	Nr. 56 G Nr. 61
Nr. C R.M. Kontrolle Kontrolle im Labor d.I. Med. Univ.Kl. München	35 J.	21.1. 16.2. 18.3.	12,8 E (k) 14,0 E (k) 15,68 (k)	Nr. 56 G Nr. 61 Nr. 61

(k) = korrigierter Properdinwert, d.h. die Properdineinheiten wurden nur aus dem 1 : 2 und 1 : 4 verdünnten Testserum berechnet (siehe Diskussion).

Die Seren A und B stammten von gesunden eineiigen Zwillingen. Auffallend ist, dass insbesondere in dem Serum A die niedrigsten Properdineinheiten in unserem gesamten Untersuchungsgut gefunden wurden. Es kann unseres Erachtens nicht völlig ausgeschlossen werden, dass ein Inhibitor der C'_3 Inaktivierung im Sinne von WILLERS und Mitarbeitern (32) für den niedrigen Properdintiter verantwortlich zu machen ist. Das Serum Nr. B ergab eindeutig normale Properdinwerte. Bei Serum Nr. C hatten wir früher festgestellt, dass das Serum dieser gesunden Versuchsperson für die Herstellung von Nährböden zur Züchtung von Pilzen ungeeignet war. Bei diesen Versuchen hatte sich gezeigt, dass auf den von Serum C hergestellten Pilznährböden nach Grütz III verschiedene Trichophytonstämme eindeutig in ihrer Wachstumstendenz gegenüber Kontrollen gehemmt wurden. Es blieb die Frage offen, ob der Antikörpergehalt des Serums oder ob unter anderem auch der hohe Properdintiter hierbei eine Rolle spielte. Interessanterweise verliefen die beiden von uns vorgenommenen Properdinbestimmungen in Serum C nicht völlig einwandfrei. Bei dem Serum C konnten wir nämlich bei beiden Properdinbestimmungen mit verschiedenen RP Chargen keine kontinuierliche prozentuale Abnahme der C'_3 Titer von unverdünntem zu 1 : 4 verdünntem Testserum finden. Wir liessen deshalb eine weitere Kontrollbestimmung im Labor, der I. Med. Univ. Klin. München durchführen, um damit auch evtl. technische Fehler zu ermitteln. Tabelle 12 zeigt die prozentualen C'_3 Titer-Abnahmen bei den Properdinbestimmungen der Seren A, B, C.

Tabelle 12

Prozentualer Abfall der C'_3 Titer der einzelnen Testserumverdünnungen
bei der Properdinbestimmung in den Seren A, B, C.

Serum Nr.	Datum	Testserumverdünnung	% C'_3 Abnahme	RP Charge
A	22.1.	unverdünnt	11 %	Nr. 56 G
		1:2 verdünnt	12,5 %	
		1:4 verdünnt	8,7 %	
Kontrolle	9.3.	unverdünnt	51 %	Nr. 61
		1:2 verdünnt	48 %	
		1:4 verdünnt	17 %	
B	22.1.	unverdünnt	16 %	Nr. 56 G
		1:2 verdünnt	68 %	
		1:4 verdünnt	19 %	
Kontrolle	9.3.	unverdünnt	55 %	Nr. 61
		1:2 verdünnt	43 %	
		1:4 verdünnt	21 %	
C	21.1.	unverdünnt	nicht verwertb.	Nr. 56 G
		1:2 verdünnt	30 %	
		1:4 verdünnt	65 %	
Kontrolle	16.2.	unverdünnt	63 %	Nr. 61
		1:2 verdünnt	40 %	
		1:4 verdünnt	65 %	
Kontrolle im Lab. d. I. Med. Univ. Klin. München	18.3.	unverdünnt	62 %	Nr. 61
		1:2 verdünnt	76 %	
		1:4 verdünnt	60 %	

VI. DISKUSSION.

Da über die Bedeutung der unterschiedlichen Properdintiter bei verschiedenen Dermatosen anhand umfangreicherer Untersuchungen an anderer Stelle berichtet werden wird, sollen hier nur die beschriebene Methodik kritisch besprochen und die Verfahren anderer Autoren diskutiert werden.

Auffällig war bei unseren Versuchen zunächst die bereits in Tabelle 12 gezeigte Beobachtung, nämlich dass die aus den Testansätzen sich ergebende C'_3 Verminderung in einigen Fällen bei unverdünntem Testserum geringer war als bei 1 : 2 dünnem Testserum. Diese zu geringe C'_3 Titerabnahme ging im allgemeinen einher mit normalen C'_3 Titern (in einem Fall allerdings mit über 1 000 Einheiten C'_3 !) in beiden Testansätzen, wobei einmal der C'_3 Titer im Zymosanan-satz sogar höher lag als im Ansatz ohne Zymosan. Da eine Zymosancharge für je 10 Properdinbestimmungen verwandt wurde und die Beobachtung nur in einem Fall gemacht wurde (Serum C), kann sie nicht auf eine Untauglichkeit des Zymosans zurückgeführt werden. Da in 0,05 ml der von uns verwandten Zymosansuspension 2 mg Zymosan enthalten waren, die zu jeweils 0,25 ml Testserum gegeben wurden, kann auch eine evtl. zu geringe Zymosankonzentration nach LEON (24) (2 mg Zymosan pro 1 ml Testserum) nicht für das auffallende Verhalten der C'_3 Titer verantwortlich gemacht werden. Wir möchten darin einmal eine mögliche Bestätigung der Ansicht LEONS (23) sehen, der in seinen kinetischen Studien nachwies, dass die Reaktion von Zymosan mit Properdin und Komplement durch unverdünntes Testserum in beiden Stufen auf Grund einer noch in unbekannter Weise erfolgenden Interferenz der C'_3 Titer des RP Serums und des Testserums gestört werden kann.

Auch ZUNUSSI (27) hat auf diese Störungen durch Summation der C'_3 Titer hingewiesen und durch Verwendung eines 1 : 10 verdünnten Testserums versucht, sie auszuschalten.

Bei Kontrollbestimmungen unserer Seren (siehe Tabelle 12) mit einer anderen Charge fanden wir nun bei den Seren A und B eine kontinuierliche prozentuale C'_3 Titerabnahme. Das könnten Befunde ZUNUSSIS bestätigen, der ebenfalls Unverträglichkeiten von Testserum und RP Serum beobachtete. Die Befunde bei Serum C möchten wir, da die unbekannten Störfaktoren auch bei der Verdünnung 1 : 2 zu beobachten waren, mit der bereits skizzierten Ansicht LEONS erklären, die in ihrem Wirkungsmechanismus allerdings noch nicht völlig aufgeklärt ist. Um diese Fehlermöglichkeit durch noch unbekannte Vorgänge, die dem von uns verwendeten Verfahren von FRITZSCHE und Mitarbeitern grundsätzlich innewohnt, wenigstens teilweise auszuschalten, haben wir bei den Fällen, bei denen sich

keine kontinuierliche prozentuale C'_3 Titerabnahme ergab, den Wert für das unverdünnte Testserum zur Berechnung der Properdineinheiten weggelassen. Der so berechnete "korrigierte Properdinwert" ist in Tabelle 11 mit (k) bezeichnet. Die "korrigierten Properdinwerte" liegen um ca. 1 - 2 Einheiten höher als die nicht korrigierten Titer.

Vergleicht man nun die Methodik von FRITZSCHE und Mitarbeitern mit den bereits geschilderten Verfahren anderer Autoren (LEON, ZANUSSI, SOULIER, PONDMAN), so erscheinen ausser der von uns in Übereinstimmung mit LANG vorgenommenen rechnerischen Ermittlung der Properdineinheiten, der von uns aufgezeigten Kontrollmöglichkeit der methodischen Fehlerbreite und der Korrektur nicht einwandfrei zu ermittelnder Properdinwerte, noch weitere Änderungen empfehlenswert.

Auf Grund der Erkenntnisse LEONS (23, 24), ZANUSSI (27) und unserer eigenen Beobachtungen schlagen wir für die Modifikation von FRITZSCHE, SCHULTZE und Mitarbeitern vor, das Testserum 1 : 2, 1 : 4 und 1 : 10 zu verdünnen, um die Störungen durch unverdünntes Testserum auszuschalten. Aus den Ergebnissen des Arbeitskreises um ZANUSSI (27) über die Abhängigkeit der PZ Bildung von der Zeit ist zu folgern, dass die Inkubation der Testansätze mit Zymosan bei 37°C statt 60 Minuten mindestens 90 Minuten betragen sollte, um tatsächlich das gesamte vorhandene Properdin eines Testserums in den PZ Komplex zu überführen.

Ändert man also die Methodik von FRITZSCHE und Mitarbeitern in den angeführten Punkten, so wird das Verfahren umständlicher, abgesehen von den nicht unerheblichen zeitlichen, technischen und finanziellen Aufwendungen. Damit sind aber noch nicht die Wirkung von Inhibitoren der C'_3 Inaktivierung (SOULIER, PONDMAN) und die Störungen durch Unverträglichkeit des RP Serums und des Testserums (ZANUSSI) ausgeschaltet. Deshalb erscheint uns das Verfahren von FRITZSCHE und Mitarbeitern nicht voll befriedigend, zumal auch durch die von der klassischen Definition PILLEMERS abweichende Definition einer Einheit Properdin Schwierigkeiten in der Interpretation der Ergebnisse auftreten.

Bei einer kritischen Betrachtung der im vorausgehenden Teil geschilderten Methoden der Properdinbestimmung, die auf der Verwendung von Zymosan beruhen, halten nur die Modifikation LEONS und die auf der ISLIKER'schen Konzeption beruhende Modifikation von WILLERS, PONDMAN und Mitarbeitern den angeführten Einwänden stand. Bei diesen beiden Modifikationen werden praktisch alle bislang bekannten Störfaktoren berücksichtigt. Die Modifikation von ZANUSSI und Mitarbeitern (27) erscheint uns ebenfalls sehr gut anwendbar, jedoch wird auch dabei die Einwirkung von Inhibitoren der C'_3 Inaktivierung nicht ausgeschaltet. Die Modifikation SOULIER'S ist elegant, aber mit möglichen Störfaktoren behaftet,

da einerseits nur angereicherte Properdinpräparate verwendet werden, andererseits noch nicht völlig abgeklärt ist, welche Veränderungen ein zugesetztes Properdinpräparat in einem Serum erfährt.

LEON (25) hat den Begriff des "available Properdin" geschaffen. Das available Properdin ist das im Augenblick in vivo verfügbare Properdin, abhängig vom System der übrigen Komplementfaktoren einschliesslich der bislang gefundenen Wirkung von Inhibitoren. Bei der Bestimmung des "available Properdin" im Serum unterbleibt ein Zusatz von Cofaktoren, der bei allen anderen Methoden, die der Bestimmung des Gesamtproperdins dienen, erfolgt. FRITZSCHE und Mitarbeiter (15) haben mit der Modifikation LEONS gearbeitet und dabei auf Grund der nach MAYER und HEIDELBERGER (52) vorzubereitenden Erythrozyten erhebliche Schwierigkeiten gefunden. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, haben sie vorgeschlagen, zusätzlich zur Properdinbestimmung eine Bestimmung der Komplementkomponenten $C_1 - C_4$ mit standardisierten Reagenzien durchzuführen. Damit können die Seren erfasst werden, die einen Mangel an Cofaktoren aufweisen. Aus dem Properdintiter und den Titern der einzelnen Komplementkomponenten sind dann Rückschlüsse auf den in vivo wirksamen Properdintiter möglich.

Aus dem Gesagten ergibt sich, dass praktisch nur die Modifikation von WILLERS, PONDMAN und Mitarbeitern alle bisher bekannten Fehlermöglichkeiten bei der Bestimmung des Gesamtproperdins ausschaltet. Wir fanden in der uns zugänglichen Publikation der Autoren (32) nicht genügend technische Angaben, um mit ihrer Modifikation Kontrollbestimmungen durchzuführen.

Im folgenden möchten wir deshalb eigene Vorschläge zur Bestimmung des Gesamtproperdins machen, die sich an die auf den Vorstellungen ISLIKERS beruhende Modifikation von WILLERS, PONDMAN und Mitarbeitern anlehnen.

Zunächst wird der C' Titer des zu verwendenden RP Serums in der beschriebenen Weise bestimmt.³ Dann wird eine Reihe von 7 Röhrchen in ein Eisbad gebracht. In das erste Röhrchen werden 0,2 ml des zu untersuchenden Serums pipettiert. Die folgenden 6 Röhrchen werden mit je 0,1 ml vorgekühlter Pufferlösung beschickt. Nun werden 0,1 ml des Testserums aus dem Röhrchen 1 in das folgende pipettiert, aus diesem Röhrchen wiederum 0,1 ml in das nächste usw. Aus dem letzten Röhrchen werden 0,1 ml verworfen. Damit ist eine Verdünnungsreihe von unverdünntem bis 1 : 64 verdünntem Testserum hergestellt. Jetzt erhält jedes Röhrchen 0,1 ml vorgekühltes ($+ 4^{\circ}C$) RP Serum und 0,1 ml Zymosansuspension (entspricht 4 mg Z). Unter Schütteln in Abständen von 10 Minuten werden nun die Röhrchen 75 Minuten bei $16^{\circ}C$ inkubiert. Nach beendiger Inkubation werden die Röhrchen kühl zentrifugiert (3 Min. bei 2000 U/Min., Temperatur unter $17^{\circ}C$), die Überstände abgegossen, der PZ Komplex mit vorgekühlter

Pufferlösung einmal gewaschen, erneut kühl zentrifugiert und die Überstände wieder verworfen.

Die Röhrchen enthalten jetzt fallende Mengen des PZ Komplexes. Jedem Röhrchen wird nun eine konstante Menge C'_3 (z. B. 0,2 ml eines RP Serums mit 120 E C'_3) in Form eines inhibitorfreien RP Serums zugesetzt, wozu die RP Chargen der Behringwerke verwendet werden können (49). Damit sind auch die übrigen Komplementkomponenten in ausreichender Konzentration vorhanden. Unter Schütteln alle 10 Minuten werden die Röhrchen eine Stunde im Wasserbad von 37°C inkubiert, anschliessend jedem Röhrchen 1,0 ml des haemolytischen Systems zugefügt (hierbei sind die Erythrozyten in Pufferlösung und nicht in phys. NaCl-Lösung zu suspendieren) und die Röhrchen erneut für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Nach Abzentrifugieren der nicht gelösten Erythrozyten und des PZ Komplexes wird die Extinktion des Röhrchens mit eben beginnender Haemolyse und des folgenden Röhrchens in der beschriebenen Weise bestimmt. Im Allgemeinen wird damit ein Haemolysegrad unter und oberhalb der 50 %-Haemolyse erfasst. Auf der log. unterteilten Abszisse eines Millimeterpapiers trägt man die Testserumverdünnungen auf, die geometrisch unterteilte Ordinate bezeichnet die prozentualen Haemolysegrade. Der Schnittpunkt der Geraden aus den beiden Messpunkten mit der 50 %-Haemolyse wird auf die Abszisse projiziert und gibt die Properdineinheiten in einem Milliliter Testserum an.

Tabelle 13 zeigt die theoretisch berechneten Ergebnisse bei der geschilderten Versuchsanordnung für ein Testserum mit 8 E, mit einer E und mit 10 Einheiten Properdin/ml. Abbildung 8 zeigt die graphische Bestimmung der Properdineinheiten für das Serum mit 10 Einheiten Properdin, wobei die zu erwartenden prozentualen Haemolysegrade theoretisch errechnet wurden. Als Grundlage unserer Überlegungen ist die PILLEMER'sche Definition einer Einheit Properdin angenommen.

Tabelle 13

Theoretisch ermittelte Ergebnisse der vorgeschlagenen Methodik.

Testserumverdünnung eines 8 E P/ml enthaltenden Serums	U	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	
Properdineinheiten in 0,1 ml der Verdünnungen	4/5	2/5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	
C' Einheiten, die bei 37° C inaktiviert werden	96	48	24	12	6	3	1,5	
In der II. Stufe konstant zugegebene C' Einheiten	24	24	24	24	24	24	24	
Zu erwartende prozentuale Haemolysegrade	--	--	?	50 %	75 %	91 %	----->	100 %
Haemolysegrade bei einem Serum mit 1 E Properdin	50 %	75 %	91 %	-----> 100 %				
Properdineinheiten in 0,1 ml eines Serums mit 10 E P.	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	
C' Einheiten, die bei 37° C inaktiviert werden	120	60	30	15	7,5	3,75	1,85	
In der II. Stufe konstant zugegebene C' Einheiten	24	24	24	24	24	24	24	
Zu erwartende prozentuale Haemolysegrade	--	--	--	37,5%	68,7%			

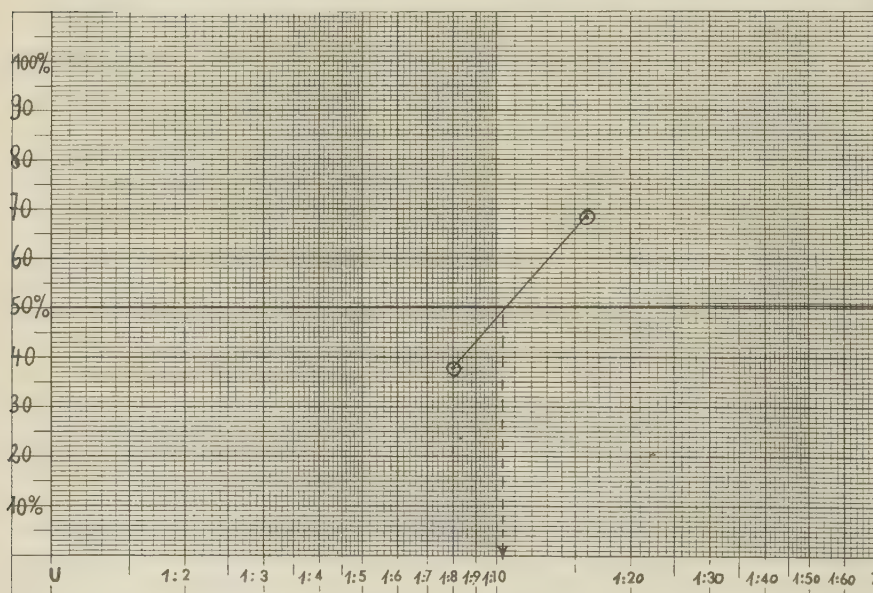
Die Tabelle 13 zeigt, dass die 50 %-Haemolyse des Serums mit 8 Einheiten Properdin bei einer Testserumverdünnung von 1 : 8, für das Serum mit einer Einheit Properdin bei unverdünntem Testserum zu finden ist. Für das Serum mit 10 Ein-

heiten liegt die 50 %-Haemolyse zwischen den Verdünnungen 1 : 8 und 1 : 16. Die Abbildung 8 zeigt die graphische Bestimmung der Properdineinheiten des Serums mit 10 Einheiten Properdin auf Grund der theoretisch errechneten prozentualen Haemolysegrade.

Abbildung 8

Graphische Ermittlung der Properdineinheiten auf Grund der theoretisch errechneten prozentualen Haemolysegrade.

‰-Haemolyse



Testserum-Verdünnung

Bei diesem Vorgehen werden Inhibitoren der C'_3 Inaktivierung und andere noch unbekannte Störfaktoren sowie der C'_3 Gehalt des Testserums durch die Kälteinkubation und das Verwerfen des Überstandes, soweit möglich, ausgeschaltet. Da der Zusatz eines R_3 Serums unterbleibt - die in beiden Stufen erfolgende RP Serum-Zugabe ergibt stets einen Überschuss der anderen Komplementkomponenten - wird auch einer Beobachtung DRESSLERS (28) Rechnung getragen.

DRESSLER hatte festgestellt, dass der C'_3 Titer eines RP Serums dem R_3 in steigender Menge zugesetzt wird, nicht einen bestimmten Endwert erreicht, sondern entsprechend der Quantität des hinzukommenden R_3 weiter ansteigt.

Die Properdineinheiten werden bei der vorgeschlagenen Methodik unter Beibehaltung der PILLEMER'schen Definition einer Einheit Properdin bei einer 50 %igen Haemolyse ermittelt. Weitere Vorteile in der vorgeschlagenen Methodik sehen wir in dem geringeren Aufwand an Geräten und finanziellen Mitteln. Ausserdem sind weniger Pipettierungen erforderlich, keine Berechnungen nur nur eine graphische Zeichnung nötig.

ZUSAMMENFASSUNG

Nach einem einleitenden Überblick über die Geschichte der Entdeckung des Properdins durch PILLEMER werden die wesentlichen physikalisch-chemischen und serologisch-biologischen Eigenschaften der Properdins angeführt. Die Properdintiter in den Seren gesunder und kranker Personen werden gezeigt und die Schwierigkeiten einer vergleichenden Beurteilung auf Grund der unterschiedlichen Methoden der Properdinbestimmung erläutert. Die Originalmethode PILLEMERS wird ausführlich besprochen und die sich aus ihr ergebenden zahlreichen Modifikationen kritisch gewürdigt.

Mit der in einigen Punkten von uns in Übereinstimmung mit LANG geänderten Modifikation von FRITZSCHE, SCHULTZE und Mitarbeitern, die eingehend beschrieben wird, werden vergleichende Properdinbestimmungen durchgeführt. Die Fehlermöglichkeiten der von uns benutzten Methode werden ausführlich geschildert. Die Verfahren anderer Autoren werden diskutiert und nach einer kritischen Gegenüberstellung der Vor- und Nachteile der einzelnen Modifikationen werden eigene Vorschläge zur Bestimmung des Gesamtproperdins gemacht.

LITERATUR

- 1) EHRLICH, P., MORGENROTH, I.:
 "Über den Mechanismus der Ambozeptorenwirkung."
 Berl. klin. Wschr. 1899, 36, 6.
- 2) FERRATA, A.:
 Zit. nach H. SCHMIDT: Das Komplement.
 Darmstadt, Steinkopff, 1959.
 Berl. klin. Wschr. 1907, 366.
- 3) RITZ, H.:
 "Über die Wirkung des Cobragiftes auf die Komplemente."
 Zit. nach H. SCHMIDT: Das Komplement.
 Darmstadt, Steinkopff 1959.
 Z. Immunit. Forschg. 13, 62 (1912)
- 4) GORDON, I., H. B. WITHEHEAD und A. WORMALL:
 "The action of ammonia on complement, the fourth component."
 Biochem. J. 20, 1029 (1926)
- 5) HEGEDÜS, A., GREINER, H.:
 "Quantitative Bestimmung der Komplementbestandteile."
 Z. Immunit. Forschg. 92, 1 (1938)
- 6) KABAT, E. A., MAYER, M. M.:
 "Experimental Immunochemistry."
 Thomas Springfield S 100 ff (1948)
- 7) PILLEMER, L., BLUM, L., LEPON, J. H., ROSS, O. H., TODD, E. W., WARDLAW, A. C.:
 "The Properdin System and Immunity I. Demonstration and Isolation of a new serum Protein, properdin, and its role in immune phenomena."
 Science 120, 279 (1954)
- 8) WARDLAW, A. C., PILLEMER, L.:
 "The Properdin System and Immunity V. The bactericidal activity of the properdin system."
 J. Exp. Med. (N. Y.) 103, 553 (1956)

- 9) COCA, A.F.: "A study of the anticomplementary action of yeast, of certain bacteria of cobra venom."
Z. Immunit. Forschg. 21, 604 (1900)
- 10) PILLEMER, L., BLUM, L., LEPOW, I.H., WURZ, L., TODD, E.W.:
"The Properdin System and Immunity III. The Zymosan Assay of Properdin."
J. Exp. Med. (N.Y.) 103, 1, (1956)
- 11) LANG, W.: "Blutbakterizidie, Komplementfaktoren und Properdinsystem."
Münch. med. Wschr. 1959, 8.
- 12) SCHEFFARTH, F., FRENGER, W., GÖTZ, H.:
"Immunoelktrophoretische Studien am Properdin-Zymosan und Properdin-Inulin-Komplex."
Klin. Wschr. 1958, 367.
- 13) KELLER, H., ISLIKER, H., AEBI, H.:
"Zum Turnover des Properdins beim Kaninchen."
Acta Helvet. physiol. 15, C21-C23 (1957)
- 14) ISLIKER, H.C.: "The Properdin System, a review."
Vox sang. 1, 8 (1956)
- 15) FRITZSCHE, W., FISCHER, H., SCHWICK, G., SCHULTZE, H.E.:
"Über die Bestimmung von Properdin und Komplementfaktoren."
Klin. Wschr. 1958, 100.
- 16) ROTTINO, A., LEVY, A.L., BIANCO, A.:
"Serum Properdin levels in patients with Hodgkins disease and carcinoma."
Cancer 10, 877 (1957)
- 17) KENT, I.F., TOUSSAINT, A.J., HOOK, A.W.:
"Adaption of the Zymosan Assay of Properdin to animal sera."
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 96, 676 (1957)
- 18) DRESSLER, O.: "Immunochemische Studien über das Properdin-Komplementsystem. Der Properdin-Komplement-Titer gesunder Menschen in Abhängigkeit von der Zeit." Klin. Wschr. 1958, 799.

- 19) GRAEVENITZ, A.v.: "Zur Bestimmung des sog. available Properdin." *Ärztl. Forschg.* 14, 3 (1960)
- 20) FUMAROLA, D.: "Introduzione alla studio del sistema properdinico: il tasso properdinico nell'infanzia." *Zit. nach H. SCHMIDT: Das Properdin. Darmstadt, Steinkopff 1959.*
Boll. Instit. Siero. terap. Milan. 37, 87 (1958)
- 21) KOCH, Fr., SCHULTZE, H.E., SCHWICK, G.: "Komplementfaktoren und Properdin beim gesunden Säugling." *Klin. Wschr.* 1958, 17.
- 22) SCHULTZE, H.E., SCHWICK, G.: "Das Properdinproblem." *Blut* 4, 286 (1958)
- 23) LEON, M.A., CHEPMAN, E.: "Quantitative studies on the properdin complement system." *J. Exp. Med. (N.Y.)* 103, 285 (1956)
- 24) LEON, M.A.: "Quantitative studies on the properdin complement system II. Kinetics of the reaktion between properdin and zymosan." *J. Exp. Med. (N.Y.)* 105, 403 (1956)
- 25) LEON, M.A.: Vortrag auf dem VI. Kongress der Europ. Ges. f. Haematologie. Kopenhagen 1957.
Zit. Ref. TB Blut 4 (1958)
- 26) ISLIKER, H.C., LINDER, E.: "Methods for the Assay of Properdin." *Vox.sang.* 3, 23 (1958)
- 27) ZANUSSI, C., TASCHINI, P., SELVA, G., ORTOLANI, C.: "Validita e limiti del dosaggio delle properdin serica mediante zymosan." *Zit. nach H. SCHMIDT: Das Properdin. Darmstadt, Steinkopff 1959.*
Boll. Instit. Siero. terap. Milan. 37, 273 (1958)

- 28) DRESSLER, O.: "Immunochemische Studien über das Properdinsystem, 1. Quantitative Bestimmung des Properdins in Humanserum, 2. in Mausserum, 3. in Meerschweinchen- und Schweineserum, 4. in Rattenserum." Z. Immunit. Forschg. 117, 450 (1959)
- 29) SOULIER, J. P., MÉNACHÉ, O.: "Variationes pathologiques du complément et de la properdine chez L'homme." Acta haemat. 20, 260 (1958)
- 30) SOULIER, J. A., LARRIEU, J. M.: "Dosages de properdine-étude technique." Rev. franc. et Clin. Biol. II, 857 (1957)
- 31) SOULIER, J. P.: "Complement et Properdine." Rev. franc. et Clin. Biol. I, 443 (1956)
- 32) WILLERS, J. M. N., PONDMAN, K. W., WINKLER, K. C.: "An improved Properdin titration, based on the elimination of an inhibitor." Vox. sang. 4, 21 (1959)
- 33) PILLEMER, L., SCHOENBERG, M. B., BLUM, L., WURZ, L.: "The Properdinsystem and Immunity II. Interaction of the properdinsystem with polysaccharides." Science 122, 545 (1955)
- 34) McNALL, E. G.: "Assay of properdin in biological fluids." Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (N. Y.) 94, 399 (1957)
- 35) HEISE, E. R.: "Untersuchungen über das Properdinsystem I. Über die Inaktivierung der 3. Komplementkomponente durch Zymosan oder Inulin." Klin. Wschr. 1958, 88.
- 36) HINZ, C. F. jr., ABRAHAM, J., PILLEMER, L.: "Requirement for properdin in haemolysis of human erythrocytes treated with tannic acid." Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (N. Y.) 94, 230 (1957)
- 37) PILLEMER, L., HINZ, C. F. jr., WURZ, L.: "Preparation and properties of antihuman properdin rabbit serum." Science 125, 1244 (1957)

- 38) BARANDUN, S., ISLIKER, H.C.:
Vortrag 284. Europ. Ges. f. Haematologie
Kopenhagen 1957.
- 39) SCHULTZE, H.E.:
"Zur Kenntnis der Alpha-Globuline des menschlichen Normalserums."
Zschr. Naturforschg. 10 b, 463 (1955)
- 40) ISLIKER, H.C., LINDER, E.:
"Zur Darstellung eines baktericiden Serum Eiweisses (Properdin)."
Acta Helvet. physiol. 14, C34-C35 (1956)
- 41) RATNOFF, O.D.:
Zitiert bei PILLEMER siehe 10.
- 42) WEDGWOOD, R.J.:
"The influence of antibodies on the activity of the properdin system."
Vortrag 296, Europ. Ges. f. Haematologie
Kopenhagen 1957.
- 43) BLATTBERG, B.:
"Increase in bactericidal activity as a result of injection of zymosan."
Proc. Soc. Exp. biol. Med. (N.Y.) 92, 745
(1956)
- 44) NELSON, R. A. jr.:
"An alternative Hypothesis for the Properdin-system."
Vortrag Nr. 290. VI. Kongr. Europ. Ges. f. Haematologie
Kopenhagen 1957.
Acta haemat. 20, 275 (1958)
- 45) SKARNES, R.C., WATSON, D.W.:
"Antimicrobial factors of normal tissues and fluids."
Bakt. Reviews. 21, 273 (1957)
- 46) BARLOW, J.L., LEVINE, L., VUNAKIS, H.v.:
"Studies on the inactivation of phage by the properdin system."
Fed. Proc. 16, 405 (1957)
- 47) Mündliche Mitteilung Labor der I. Med. Univ. Klinik München.
- 48) LANG, W.:
Mündliche Mitteilung.
- 49) SCHULTZE, H.E.:
Schriftliche Mitteilung.

- 50) VICTOR, D., NEWCOMER, McNALL, E.G., HALDE, C., WRIGHT, E. T.,
STERNBERG, T.H.: "Evaluation of the level of properdin in normal
adult humans and in certain disease states."
J. Invest. Dermat. 30, 233 (1958)
- 51) McNALL, E.G., NEWCOMER, V.D., STERNBERG, T.H.:
"The effect of altered properdin levels in mice on
the course of systemic mycotic infections."
J. Invest. Dermat. 32, 424 (1959)
- 52) MAYER, M. M., HEIDELBERGER, M., OSLER, A.G., BIER, O.B.:
"The activating effect of magnesium and other ca-
tions on the haemolytic funktion of complement."
J. Exp. Med. (N. Y.) 84, 535 (1946)
- 53) PLESCIA, O.J., AMIRAIAN, K., CAVALLO, G.:
"Inhibition of immune haemolysis by proteins and
peptides."
Zit. nach H. SCHMIDT: Das Komplement.
Darmstadt Steinkopff, 1959.
Fed. Proc. 16, 429 (1957)
- 54) SCHEIFFARTH, F., FRENGER, W., RINGELMANN, R.:
"Eine quantitative Methode der Serum-Properdinbe-
stimmung mit Inulin."
Klin. Wschr. 1960, 291.
- 55) PILLEMER, L., ECKER, E.E.:
"Anticomplementary factor in fresh yeast."
Z. Biol. Chem. 137, 139 (1941)

Herrn Professor Dr. A. MARCHIONINI danke ich für die Möglichkeit, in den Laboratorien der von ihm geleiteten Klinik die Versuche durchführen zu dürfen.

Insbesondere bin ich meinem verehrten Referenten, Herrn Privat-Dozent Dr. K. MEINICKE, für die Auswahl des Themas und seine freundliche Hilfe zu ständigem Dank verpflichtet.

Bei Herrn Privat-Dozent Dr. W. LANG habe ich mich für seine freundliche Beratung zu bedanken.

Ferner gilt mein Dank Fräulein Sigrid NENZEL und Frau WIEMER für ihr verständnisvolles Entgegenkommen bei den Laborarbeiten.

LEBENS LAUF

Am 6. September 1935 wurde ich Felix, Franz, Rasso Schreiber als Sohn des Zahnarztes Dr. med. dent. Ernst Schreiber und der Zahnärztin Dr. med. dent. Rosemarie Schreiber, geb. Lins in Nürnberg geboren. Im Juni 1953 beendete ich meine Schulausbildung mit der Reifeprüfung am humanistischen Melanchthon-Gymnasium in Nürnberg. Im Herbst 1953 begann ich das Studium der Medizin an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen. Ende des Wintersemesters 1955/56 bestand ich die ärztliche Vorprüfung an der dortigen Universität. Die ersten drei klinischen Semester studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Im Wintersemester 1957/58 wechselte ich an die Medizinische Akademie in Düsseldorf über. Zu Beginn des Sommersemesters 1958 kam ich nach München zurück. Am Ende des Wintersemesters 1958/59 legte ich mein medizinisches Staatsexamen an der Ludwig-Maximilians-Universität in München ab. Seit dem 1. Juli 1959 bin ich als Medizinalassistent tätig.

